



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE CATALUNYA
BARCELONATECH

Campus del Baix Llobregat



Influència del mètode d'agitació en el creixement d'un tanc d'algues (*Ulva ohnoi*) integrat en un sistema d'aqüicultura multitròfica (IMTA).

Alumne: Nil Toro Girabent
Tutor: Joan Oca Baradad
Catelldefels, Juny de 2018

Resum

L'aqüicultura multitròfica integrada està despertant l'interès entre els productors de peix perquè pot millorar la sostenibilitat d'aquesta activitat mitjançant l'ús des residus dels peixos per a fer créixer espècies d'algues d'interès comercial.

La limitació més important a l'expansió de la producció integrada peix-algues és la gran àrea de cultiu d'algues necessària per assolir l'absorció de nutrients convenient per reduir significativament la producció de residus. És molt important augmentar la producció d'algues i l'absorció de nutrients per unitat de superfície. Això pot estar influenciat pel disseny del tanc i el sistema d'agitació d'algues, que té un paper important en la disponibilitat de la llum. L'objectiu principal d'aquest treball és analitzar la influència dels sistemes d'agitació en el creixement de les algues, en funció de la càrrega de nutrients.

Es van dur a terme tres experiments amb una durada de tres setmanes. En tots els experiments, es van utilitzar dos tancs amb geometria, condicions d'il·luminació i densitat de cultiu idèntiques.

Per assegurar que no hi havia diferències de qualitat de l'aigua entre els dos tancs; una bomba barrejava i recirculava l'aigua d'ambdós tancs en un circuit tancat a una proporció de 3,3 renovacions per hora.

En el primer experiment, realitzat amb una alta càrrega de nutrients, es van comparar dos sistemes d'agitació; un d'ells, basat en l'aeració inferior, proporcionava un nivell de turbulència més alt. A l'altre, l'agitació era produïda per jets d'aigua que penetren en el tanc, produint un nivell de turbulència més baix però una agitació més homogènia.

En el segon experiment, les condicions van ser les mateixes que en el primer, però es va realitzar amb una baixa càrrega de nutrients.

En el tercer experiment, ambdós tancs es van configurar amb sistemes d'aeració inferior amb elevada càrrega de nutrients. Es van utilitzar dos fluxos d'aire per proporcionar diferents nivells d'agitació.

Durant els tres experiments es van realitzar diversos anàlisis de mostres. Dos cops per setmana es mesurava la producció de biomassa i es guardava certa biomassa per a la determinació de nitrogen orgànic i fòsfor als teixits. Tres cops per setmana es recollien mostres d'aigua per a l'anàlisi de nutrients, es va determinar el contingut de clorofil·la de les algues al principi i al final de cada experiment.

Els resultats obtinguts mostren que el mètode d'agitació influeix en el creixement de les algues només quan la disponibilitat de nutrients és un factor limitant.

El mètode d'agitació per jets d'aigua sembla proporcionar una distribució més uniforme de la llum sobre les algues, però la seva influència sobre el creixement de les algues i l'absorció de nutrients no s'ha demostrat.

Resumen

La acuicultura multitrófica integrada está despertando interés entre los productores de pescado porque puede mejorar la sostenibilidad de esta actividad mediante el uso de desechos de peces para cultivar especies de algas de interés comercial.

La limitación más importante para la expansión de la producción integrada de peces y algas marinas es el área de cultivo de algas marinas necesaria para alcanzar la absorción necesaria de nutrientes a fin de reducir la producción de residuos. Es muy importante aumentar la producción de algas marinas y la absorción de nutrientes por unidad de superficie. Esto puede verse influido por el diseño del tanque y el sistema de agitación de algas, que juega un papel importante en la disponibilidad de la luz. El objetivo principal de este trabajo es analizar la influencia de los sistemas de agitación a diferentes niveles de carga de nutrientes en el crecimiento de algas y la capacidad de biorremediación.

Se llevaron a cabo tres experimentos que duraron tres semanas cada uno. En todos los experimentos, se usaron dos tanques con geometría, condiciones de iluminación y densidad de almacenamiento idénticas.

Para asegurar que no hubiera diferencias en la calidad del agua entre ambos tanques; una bomba mezclaba y recirculaba el agua de ambos tanques en un circuito cerrado en una proporción de 3.3 renovaciones por hora.

En el primer experimento, llevado a cabo con una alta carga de nutrientes, se compararon dos sistemas de agitación; uno de ellos, basado en la aireación sumergida, proporcionando un nivel de turbulencia más alto. En el otro, la agitación fue producida por los jets de agua que penetraban en el tanque produciendo un nivel de turbulencia más bajo pero un volteo más homogéneo.

En el segundo experimento, las condiciones fueron las mismas que en el primero, pero se realizó con una baja carga de nutrientes.

En el tercer experimento, ambos tanques fueron configurados con sistemas de aireación sumergida y alta carga de nutrientes. Se usaron dos velocidades de flujo de aire para proporcionar diferentes niveles de agitación.

Durante los tres experimentos, se realizaron análisis y recolección de muestras de manera regular. Dos veces a la semana se medía la productividad de biomasa y se guardaba parte de la biomasa para el análisis de nitrógeno orgánico y fósforo. Tres veces por semana se tomaban muestras de agua para el análisis de nutrientes, se determinó el contenido de clorofila en las algas al comienzo y al final de cada experimento.

Los resultados obtenidos muestran que el método de agitación influye en el crecimiento de algas solo cuando la disponibilidad de nutrientes es un factor limitante. El método de agitación por jets de agua parece proporcionar una distribución más uniforme de la luz sobre las algas, pero su influencia sobre el crecimiento de algas y la absorción de nutrientes no se ha demostrado.

Abstract

Integrated multitrophic aquaculture is gaining importance between fish producers because it can improve the sustainability of this activity by using fish wastes to grow up algae species of commercial interest, in our case *Ulva ohnoi*.

The most important limitation to the expansion of fish-seaweed integrated production is the large seaweed culture area required to reach the necessary uptake of nutrients in order to significantly reduce their concentration. It makes very important to increase the seaweed production and nutrients uptake per unit surface. This can be influenced by the tank design and the algae agitation system, which plays an important role in light availability. The main goal of this work is to analyze the influence of the agitation systems at different nutrient load levels in algae growth and bioremediation capacity.

Three experiments lasting three weeks each were conducted. In all the experiments, two tanks with identical geometry, lighting conditions and stocking density were used. To assure that there were no differences of water quality between both tanks; a pump mixed and recirculate the water of both tanks in a closed loop at a ratio of 3.3 renewals per hour.

In the first experiment, conducted at a high nutrient load, two agitation systems were compared; one of them, based in bottom aeration, provided a higher turbulence level. In the other, the agitation was produced by water jets entering into the tank, producing a lower turbulence level but a more homogeneous tumbling.

In the second experiment the conditions were the same than in the first one, but it was conducted at a low nutrient load.

In the third experiment both tanks were set up with bottom aeration systems and high nutrient loads. Two different airflow rates were used to provide different agitation levels.

During all three experiments sample collecting and analysis were regularly made. Twice a week biomass yield was checked and some biomass kept for organic nitrogen and phosphorous analysis. Three times per week water samples were collected for nutrient analysis, algae chlorophyll analysis was made at the beginning and at the end of each experiment.

The results obtained show that the agitation method influences the algae growth only when the availability of nutrients is a limiting factor.

The water jet agitation method seems to provide a more uniform distribution of light over the algae, but its influence on the algae growth and nutrient uptake has not been currently proved.

Agraïments

A la meva família per recolzar-me en tot moment i donar-me forces quan més ho he necessitat. A Joan Oca per fer-me descobrir el món de l'aqüicultura, la comprensió, paciència, ajuda i les hores invertides. A Ingrid Masaló per la seva ajuda i suport en tot moment; a María Rodríguez, Maria Julia, Sheila Alcalà i Patricia Jiménez per l'ajuda amb les anàlisis químiques i el material de laboratori. A Samuel Machado per ser un company, mentor i sobretot amic al laboratori; als meus amics per animar-me i motivar-me.

Continguts

1. Introducció.....	8
1.1. Situació actual de l'aqüicultura.....	8
1.2. Aqüicultura multitròfica integrada (IMTA).....	10
1.3. Les macroalgues marines.....	13
1.3.1. Morfologia i anatomia.....	13
1.3.2. Nivells d'organització.....	14
1.3.3. Classificació.....	14
1.3.4. Aplicacions de les macroalgues.....	17
1.3.5. Mercat i potencial.....	18
1.4. El gènere Ulva.....	19
1.4.1. Aplicacions.....	19
1.4.2. Reproducció i cicle de vida.....	20
1.4.3. Espècies mes utilitzades per al cultiu.....	21
1.5. Factors que influeixen en el creixement d'Ulva Ohnoi.....	21
1.5.1. Temperatura.....	21
1.5.2. Carboni inorgànic i pH.....	22
1.5.3. Salinitat.....	24
1.5.4. Irradiància, densitat de cultiu i fotoperíode.....	24
1.5.5. Nutrients.....	26
1.5.6. Agitació.....	27
1.6. Objectius.....	27
 2. Materials i mètodes.....	 28
2.1. Dispositiu experimental.....	28
2.2. Disseny experimental.....	31
2.2.1. Comparació de dos mètodes d'agitació en condicions d'excés de nutrients.....	31
2.2.2. Comparació de dos mètode d'agitació en condicions de dèficit de nutrients.....	32
2.2.3. Comparació entre diferents cabals d'aeració.....	32
2.3. Mètodes analítics i càlculs.....	34
2.3.1. Determinació de creixement i pes sec.....	34
2.3.2. Càlcul de la productivitat i taxa de creixement específic.....	34
2.3.3. Anàlisi mostres d'aigua.....	35
2.3.4. Determinació del contingut de clorofil·la i carotens a l'alga.....	38
2.3.5. Anàlisi mostra seca per a la determinació del nitrogen Orgànic.....	39
2.3.6. Anàlisi mostra seca per a la determinació de fòsfor a l'alga.....	40
2.3.7. Determinació de la velocitat de rotació de l'alga.....	43
2.3.8. Tractament estadístic dels resultats.....	44

3. Resultats i discussió.....	45
3.1. Comparació dels dos mètodes d'agitació en diferents condicions de disponibilitat de nutrients.....	45
3.1.1. Influència en el creixement.....	45
3.1.2. Influència en les concentracions de nitrogen i fòsfor als teixits.....	46
3.1.3. Influència en l'eliminació de nitrogen i fòsfor.....	47
3.1.4. Influència en la concentració de clorofil·la.....	49
3.2. Influència del cabal d'aeració en el creixement, en la concentració de clorofil·la i fòsfor als teixits.....	51
 4. Conclusions.....	 53
 5. Bibliografia.....	 54

1.3.1. Introducció

1.1. Situació actual de l'aqüicultura

L'aqüicultura és el cultiu d'organismes aquàtics tant en zones costeres com de l'interior que implica intervencions en el procés de cria per augmentar-ne producció. El desenvolupament d'aquesta pràctica en el món està creixent de manera accentuada com a alternativa a l'ús dels recursos pesquers tradicionals, que cada cop són més escassos. Mirant cap al futur, la FAO aproxima que abans del 2030 més del 65% dels aliments del medi aquàtic provindran de l'aqüicultura (Neori et al.,2004).

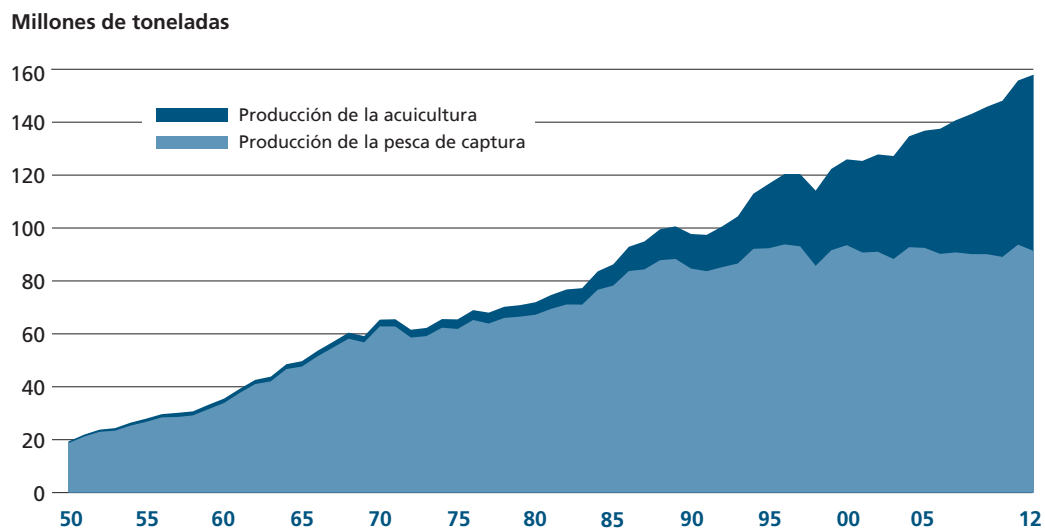


Figura 1. Producció mundial de pesca de captura i aqüicultura fins al 2012 (FAO 2014).

Així doncs, com es veu a la Figura 1, la producció total de peix i marisc a l'aqüicultura va en notable creixement, en concret l'any 2006 va augmentar 47 milions de tones i segueix creixent de l'ordre d'un 10% anual segons FAO (2006). Així doncs és possible que el sector de l'aqüicultura es trobi amb el repte de duplicar la seva producció d'aquí uns 25 anys (Soto, 2009). És per això que s'estan realitzant esforços tecnològics i de recerca per satisfer la possible demanda i solucionar els problemes ambientals que comporta aquest augment centralitzat de la producció.

Aquest problema ambiental ve provocat per l'abocament de nutrients i matèria orgànica, la qual cosa afavoreix el procés d'eutrofització (Hargrave 2005, Soto & Norambuena 2004), ja que només entre el 10 i 30% del nitrogen que s'afegeix a les gàbies de peix en forma d'aliment es recupera en forma de peix, mentre que entre el 10 i 40% del nitrogen s'allibera en partícules de matèria orgànica i la resta, que

representa aproximadament el 50%, s'excreta en formes dissoltes (Yokoyama et al., 2010). A la Figura 2 es mostren aquests percentatges en el cas d'un cultiu d'orada.

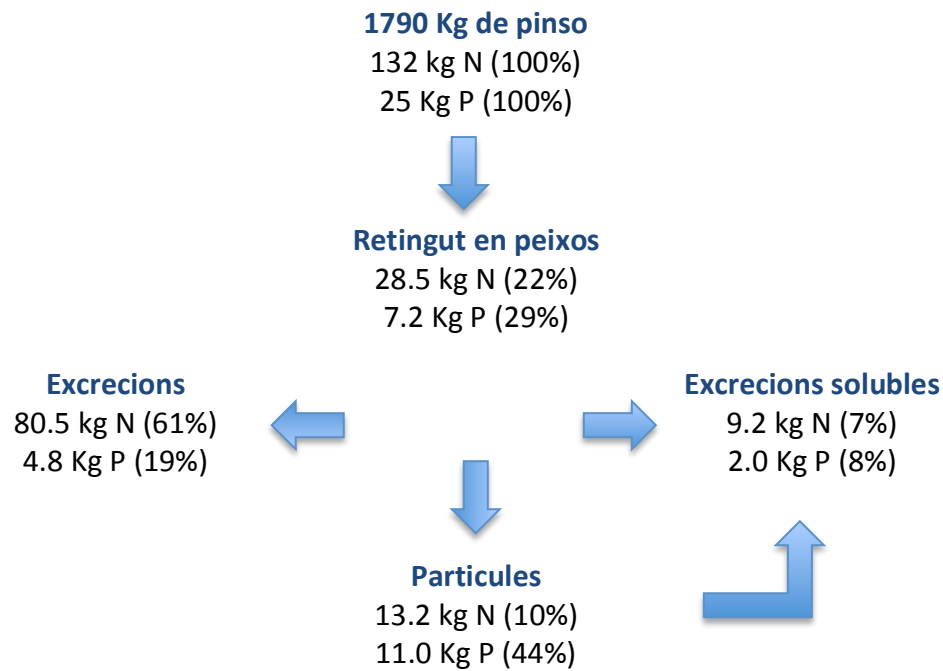


Figura 2. Balanç de nutrients d'una unitat de cultiu d'orada, on es mostren els percentatges relatius expressats en funció de l'entrada d'aliment (Lupatsch i Kissil, 1998).

Un dels àmbits on s'està focalitzant més la recerca és en l'aqüicultura multitròfica integrada (IMTA). Aquesta pràctica ens permet incloure en un mateix sistema diverses espècies, de manera, que els desfets d'una puguin ésser utilitzats com aportació per una altre.

En el nostre cas treballarem sobre l'associació de llenguados (*Solea senegalensis*) amb el cultiu de la macroalgues (*Ulva ohnoi*), amb el fi de determinar les condicions idònies de creixement d'aquestes i així controlar els nivells de toxicitat de l'amoni (NH_4^+) i el fòsfor (PO_4^{3+}).

1.2. Aqüicultura multitròfica integrada (IMTA)

El concepte IMTA és extremadament flexible. Es pot aplicar a sistemes situats mar endins (open-water), sistemes establerts a la costa o fins i tot a l'interior (land-based), sistemes marins o d'aigua dolça.

El concepte fonamental en aquest tipus d'aqüicultura és seleccionar els organismes adequats en funció del paper que desenvolupen en l'ecosistema i, a més, pel seu valor econòmic o potencial. Cal destacar que els sistemes IMTA el que fan no és res més que recrear un ecosistema simplificat i cultivat en equilibri amb el seu entorn, en lloc d'introduir un cert tipus de biomassa, esperant que sigui cultivada aïllada independentment de tota la resta (FAO 2014).

L'aqüicultura multitròfica integrada va més enllà de la sostenibilitat ambiental; proporciona una economia diversificada i redueix el risc econòmic (Taula 1), sempre i quan es triïn les espècies apropiades. Augmenta l'acceptació del sector de l'aqüicultura degut a l'ús de pràctiques avaluades com a responsables per la indústria, els reguladors i els consumidors.

Taula 1. Monocultiu de salmó en front d'un IMTA amb kelp (algues brunes de l'ordre laminarials), musclos i salmó a Canadà, en tres escenaris (Optimista, pitjor cas i intermedi), durant 10 anys, expressant els beneficis en dòlars. (Ridler et al., 2017)

Operation	Discount rate	Scenario 1 (optimistic)	Scenario 2 (worst case)	Scenario 3 (intermediate)
Salmon monoculture	NPV at 5 %	8 146 477	50 848	2 664 112
IMTA	NPV at 5 %	8 906 435	674 850	3 296 037
Salmon monoculture	NPV at 10 %	6 885 181	-228 345	2 391 135
IMTA	NPV at 10 %	7 508 913	403 579	3 014 866

Els sistemes més complets, com el que s'observa a la Figura 3, consten d'una gran quantitat de components com ara els crustacis en els esculls de mitja aigua, els alimentadors de dipòsits com els cogombres de mar, eriçons i poliquets en gàbies de fons o safates suspeses; peixos de fons en gàbies de fons, etc. Aquests components poden realitzar funcions diferents o similars, però en tot cas, per a diferents suports de mida de partícules o seleccionats per la seva presència en diferents moments de l'any (Chopin, 2013) de manera complementària.

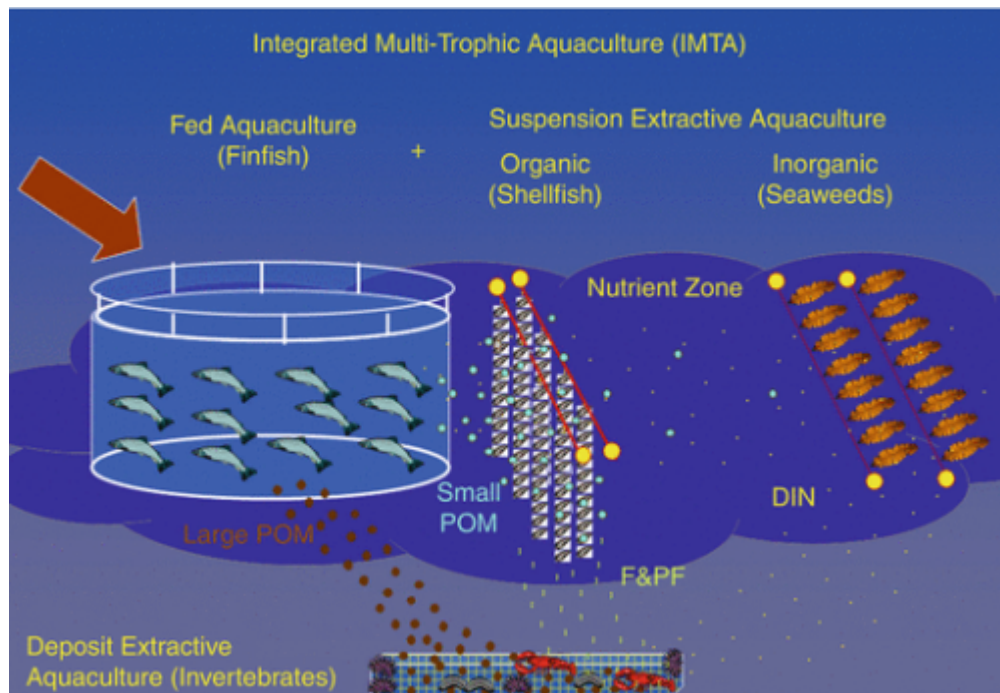


Figura 3. Diagrama conceptual d'un sistema d'aqüicultura multitròfica integrada (Chopin, 2013).

La majoria de les instal·lacions actuals només disposen d'algunes de les parts del sistema idíl·lic explicat anteriorment:

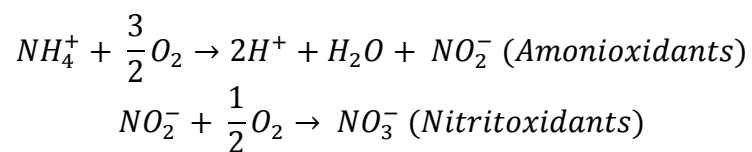
Sistemes IMTA en instal·lacions dins del mar (Figura 4). Un cas força comú seria una gàbia de peixos al mar on una part de les partícules de matèria orgànica, és aprofitada pel creixement dels mol·luscs i part del nitrogen i fòsfor, excretat en forma dissolta com a amoni (NH_4^+) i fosfat (PO_4^{3-}), són utilitzats per les algues en el seu creixement. Aquest sistema minimitza l'impacte ambiental, però la eficiència és baixa en l'eliminació de les partícules, nitrogen i fòsfor.



Figura 4. Explotació d'aqüicultura multitròfica integrada, a Canadà, que combina la cria de salmó amb mol·luscs i algues (Chopin, 2013).

Una altre variant són els sistemes IMTA que es troben a terra. Aquestes poden ser instal·lacions “flow-through”, en que l’aigua captada del mar passa una sola vegada per la instal·lació, primer pels tancs de peixos i després pels tancs d’algues i/o d’organismes filtradors. Les algues eliminen els residus dissolts com l’amoni, els filtradors eliminen les petites partícules (residus sòlids).

L’altre tipus d’instal·lacions que es troben a terra són amb recirculació (RAS). En aquestes l’aigua és tractada i es reintrodueix en el sistema, això permet que les explotacions s’allunyin de la costa gràcies a la reducció en la taxa de renovació d’aigua. En aquest cas es treballa amb concentracions més altes de nitrogen i fòsfor. El nitrogen excretat en forma amoniacal (NH_4^+) és tòxic a partir de 1mg L^{-1} , és per això que aquests sistemes incorporen un filtre biològic on es produeix una transformació de la forma amoniacal. Els microorganismes poden nitrificar el NH_4^+ fins NO_3^- en medi aeròbic gràcies a la següent reacció d’oxidació:



Aquest fet ens permet arribar a concentracions superiors a 50 mg L^{-1} de nitrogen en forma de nitrat (N-NO_3^-) (Timmons & Ebeling, 2002), ja que aquest no mostra efectes nocius fins aquest valor i per tant es pot arribar a una carrega de nitrogen total molt més elevada a l’aigua. A més a més, si combinem aquesta acció amb la producció d’algues, que consumeixen el nitrogen tant en forma amoniacal (N-NH_4^+) com de nitrat (N-NO_3^-), s’aconsegueix reduir significativament la quantitat necessària de renovació d’aigua (Abreu et al., 2011), es disminueixen els costos i la dependència a zones costaneres, fent el sistema molt més sostenible (Neori et al., 2004).

1.3. Les macroalgues marines

Aquest treball es centra en l'aqüicultura marina i la part experimental ha sigut realitzada en aquest àmbit, per això introduïrem breument les principals característiques de les macroalgues que viuen en els medis marins.

Podem definir les macroalgues marines com el conjunt de vegetals pluricel·lulars, tal·lòfits (organismes amb cos vegetatiu), els teixits dels quals es troben poc diferenciats. El seu cicle biològic es desenvolupa en el medi marí. Estan dotats de pigments fotosintètics que permeten una nutrició autòtrofa i que en alguna fase del seu cicle de vida romanen fixats al substrat marí, creant biòtops litorals més o menys homogenis.

1.3.1. Morfologia i anatomia:

Les algues pluricel·lulars no tenen els teixits complexes de les plantes vasculars (xilema i floema), aquest fet implica que en elles no podem definir les conegudes estructures d'arrels, tija i fulles. Això no vol dir que no tinguin estructures especialitzades sinó que les estructures equivalents s'han de descriure utilitzant una terminologia diferent. Tot i que no totes les algues pluricel·lulars són estructuralment complexes, el tal·lus o cos vegetatiu posseeix una o més parts característiques:

- Rizoide (també anomenat peu o disc), és una estructura present a la base de l'alga, que serveix per fixar-se al substrat. Aquesta no té la funció de captar aigua i nutrients (a diferència de les arrels).
- Estípit, equivalent a la tija, pot créixer com una estructura curta a la base de l'alga o créixer fins convertir-se en una gran estructura. A les algues estructuralment més diferenciades, els teixits dins de l'estípit es divideixen en tres capes o regions, medul·la central, escorça circumdant i una epidermis externa.
- Làmines, són les parts planes de les algues equivalents a les fulles. Algunes algues presenten una única lamina, en canvi, d'altres poden presentar-ne varies. Aquestes poden estar unides directament a l'estípit, directament al rizoides.

Algunes algues poden presentar vesícules plenes de gas anomenades nematòcits que proporcionen flotabilitat a les làmines. Això afavoreix la seva proximitat a la superfície de l'aigua i poder així rebre més llum per a la fotosíntesis.

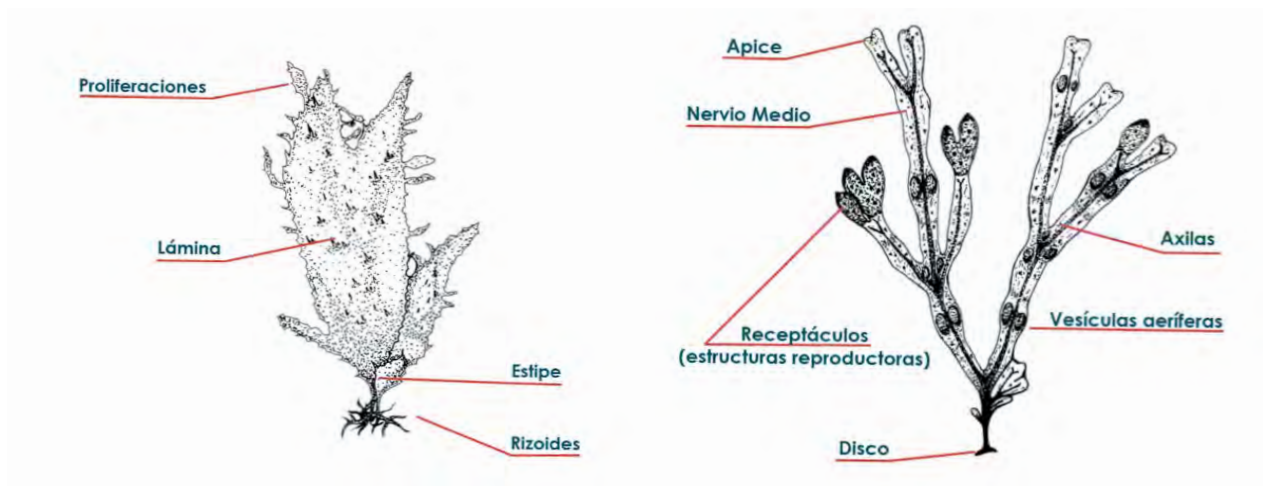


Figura 5. Exemples d'estructures de tal·lus (AROMAR 2014).

1.3.2. Nivells d'organització de les macroalgues:

El nivell d'organització es defineix com el grau de complexitat morfològica i fisiològica d'un organisme. En el cas de les macroalgues trobem els següents estaments, ordenats de menor a major complexitat:

- Colònies mòbils per flagels o immòbils.
- Filaments simples o ramificats, amb cèl·lules uni o plurinucleades.
- Làmines parenquimatoses d'una fila de cèl·lules d'espessor o dos files (*Ulva*).

1.3.3. Classificació:

La classificació de les macroalgues marines es realitza fonamentalment atenent a les diferències entre pigments fotosintètics que acompanyen a la clorofil·la "a", comuna per a tots els grups. Cal destacar que aquesta classificació engloba tant a macroalgues com a microalgues.

Algues vermelles (Rhodophyta)

Les algues vermelles són un important grup que compren unes 7000 espècies d'una gran diversitat de formes i mides (Lee et al., 2016).

Les algues vermelles contenen clorofil·la "a" i "d", així com pigments vermells i/o blaus de naturalesa proteica (ficoeritrina i ficocianina, respectivament), cosa que els hi permet captar radiacions diferents a les de les clorofil·les (APROMAR 2014).

Són principalment algues marines bentòniques, amb poques espècies d'aigua dolça. Es troben des de la regió equatorial fins a les regions polars. Les podem trobar fins a profunditats d'aproximadament 260 metres, en regions d'aigua amb elevada transparència, gràcies a la seva especial composició en pigments. La majoria són pluricel·lulars, amb només uns pocs gèneres unicel·lulars. Entre les pluricel·lulars predominen les formes filamentoses o làmines membranoses.

Les unicel·lulars es caracteritzen per la manca de qualsevol forma de moviment degut a la falta de flagels en totes les seves etapes del cicle de vida.

Les algues vermelles poden ser de vida lliure, epífites (creixen sobre un altre vegetal, utilitzant-lo només com a suport) o epizoòtiques (creixen sobre un animal sense

beneficiar-lo ni perjudicar-lo), també es coneixen algunes formes amb parasitisme (Yoon et al., 2006).

En aquest grup, comercialment parlant, destaquen les algues coral·lines que secreten carbonat càlcic i compleixen un paper crucial en la formació d'esculls de corall. A nivell alimentari destaquen l'alga *Palmaria palmata* molt utilitzada a Irlanda, Islàndia i la part atlàntica de Canadà i l'alga Nori, que és un terme japonès per anomenar a les algues comestibles del gènere *Prorhiza*. Els gèneres *Gelidium*, *Eucheuma* i *Gracilaria* són utilitzats per a la producció d'agar-agar molt utilitzat en microbiologia i en



la indústria alimentària (FAO 1990).

Figura 6. Alga vermella: *Delesseria sanguinea* (APROMAR 2014).

Algues brunes (Phaeophyceae)

Les algues amb clorofil·la "c" es coneixen amb el nom d'algues brunes, aquestes són de colors groguencs degut a l'existència de pigments accessoris com β -carotè i xantofil·les. Destaca la ficoxantina que emmascara el color verd de la clorofil·la (APROMAR 2014).

S'han descrit aproximadament 265 gèneres amb unes 2.000 espècies, principalment marines, ja que només sis gèneres són d'aigua dolça. En aigües clares poden arribar a trobar-se fins a 220 metres de profunditat (Silberfeld et al., 2014).

Tenen una gran representació en els mars temperats i freds d'ambdós hemisferis, formant frondosos boscos submarins, aquestes poden arribar fins a 60 metres de longitud (*Macrocystis pyrifera*). També es presenten en formes flotants lliures com el gènere *Sargassum*.

Existeixen algues brunes d'una ampla varietat de formes i mides, comprenen formes pluricel·lulars amb teixits força diferenciats. Generalment presenten rizoide, estípit i làmines.

En aquest grup trobem gèneres amb gran importància econòmica:

Macrocystis destaca per les aplicacions en la indústria alimentària, de la qual s'extreu l'àcid al·gínic, un agent gelificant i emulsionant. En la indústria farmacèutica i per la producció de biocombustibles gràcies a la seva alta concentració en sucres (Starthrower).

El gènere *Laminaria* comprenen un ampli ventall d'usos que van des de la indústria farmacèutica (Crépineau et al., 2000), alimentària (FAO 1990) i energètica (Milledge et al., 2014), fins a la bioremediació d'aigües contaminades degut a la capacitat d'absorbir metalls pesants (Papageorgiou et al., 2006).

Undaria pinnatífida, també coneguda amb el nom de “wakame”, és una alga comestible, que al Japó s'utilitza per a l'elaboració de la sopa de miso. Es considera una espècie invasora degut al seu potencial colonitzador (GISD).

Ecològicament cal mencionar l'espècie *Saccharina latissima*, formadora dels boscos d'algues amb gran importància biòtica. És un productor primari que entrega matèria vegetal a la xarxa alimentària costera, a més a més, els boscos que conforma serveixen com a habitat per als animals i manteniment de la biodiversitat (Christie et al., 2009).



Figura 7. Alga bruna: *Laminaria digitata* (El País, 2012).

Algues verdes (Clorophyta)

Les algues verdes, aquelles que contenen clorofil·la “a” i “b”, són un grup molt divers, amb més de 8.000 espècies, en la seva majoria continentals. Són molt variades en quant a morfologia, cicles biològics i ambients que poden colonitzar. Alguns ordres són exclusius d'aigües dolces, altres ho són d'aigües marines, en canvi altres com Cladoforals i Ulvals es poden trobar en ambos medis.

Les algues verdes poden ser unicel·lulars normalment flagel·lades o pluricel·lulars amb tal·lus morfològicament molt variables. Des de formes senzilles filamentoses, més o menys ramificades, laminars (Ulva) o discoïdals, fins a estructures complexes del tipus sifonal.

La major part de les espècies són bentòniques (estan lligades al fons), però n'hi ha de planctòniques, que viuen en suspensió i són un dels principals components del fitoplàncton (APROMAR 2014).

Dintre d'aquest grup taxonòmic i en el camp de les macroalgues marines d'interès econòmic destaquen les del gènere d'Ulva, exclusives d'aigües marines i salobres. Les espècies d'ulva proliferen en ambients il·luminats i amb excés de nutrients, és per això que abunden en zones portuàries, llocs protegits i estuaris, intervenint en les denominades mareas verdes. Aquesta espècie té importants aplicacions en la indústria alimentària, cosmètica i tractament d'aigües.



Figura 8. Alga verda: *Ulva Ohnoi*.

1.3.4. Aplicacions de les macroalgues:

Les macroalgues tenen un creixent nombre d'aplicacions. A continuació hem intentat englobar aquelles més rellevants classificant-les en sis grups (Azterkosta 2008).

1. Alimentació humana: existeixen unes 200 espècies d'algues aptes per al consum humà. En el sud-est asiàtic són consumidors habituals d'algues degut a que és un complement ideal per a la dieta, gràcies al seu elevat contingut en fibra, proteïnes, sals minerals, vitamines i oligoelements.
2. Alimentació animal: sovint, els pinso del bestiar sol estar enriquit amb farines d'algues, aportant diversos efectes positius.
3. Agricultura: per a millorar les propietats físiques del sòl, millora la seva estructura i n'augmenta la capacitat de retenir aigua.
4. Indústria: és l'aplicació més àmplia i coneguda de les algues en el mercat, s'utilitzen en la indústria farmacèutica, cosmètica, extracció de ficocol·loides (com l'agar), etc.
5. Energia: es pot obtenir gas metà mitjançant la fermentació anaeròbica de certes algues, també, mitjançant altres processos es pot obtenir biodièsel i bioetanol.
6. Bioremediació: moltes macroalgues tenen la capacitat d'absorbir contaminants o certes substàncies químiques de l'aigua com els metalls pesants.

1.3.5. Mercat i potencial:

Les algues tenen un gran i ràpid creixement global de mercat, la indústria de les macroalgues ha augmentat molt en les últimes dècades. Es calcula que el 2012 es van produir casi 23,8 milions de tones d'alga a nivell mundial, la qual cosa va significar un augment de producció del 116% respecte les tones produïdes deu anys enrere. Aquesta indústria té un valor anual de 5,5 bilions de dòlars dels quals el 83,33% provenen de productes per a l'alimentació humana (FAO 2014). Amb les dades també s'ha observat la tendència a augmentar del valor econòmic d'aquestes (RIRDC Publication No. 09/005).

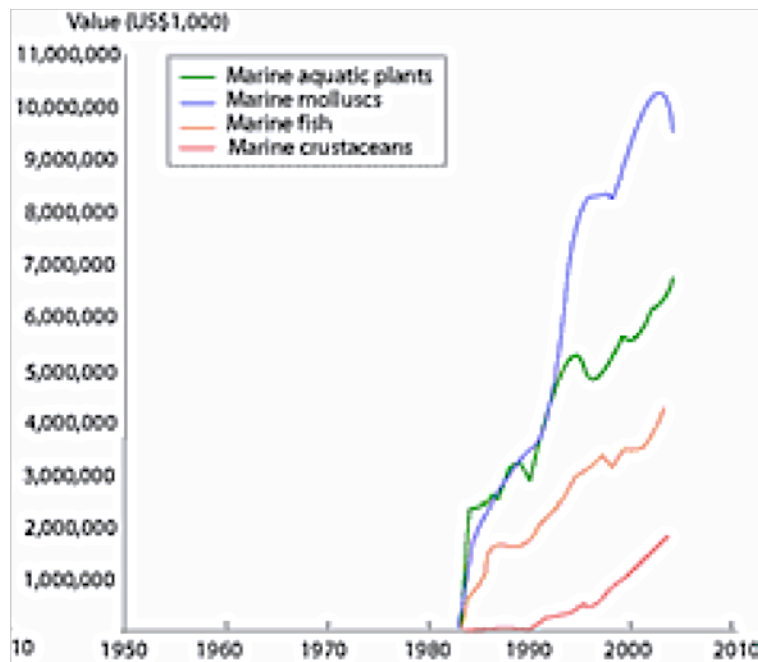


Figura 9. Valor global dels productes de l'aqüicultura (RIRDC Publication No. 09/005).

Productes d'elevat valor com els farmacèutics i nutricionals (Taula 2), apunten a ser els més competitius en el mercat d'algues. Tot i això, aquest mercat requereix un mig-llarg període de recerca i desenvolupament previ a la comercialització (Smit 2004).

Taula 2. Llistat de mercats ordenats per valor (RIRDC Publication No. 09/005).

Market	Value/weight seaweed	Commercial Production
1. Pharmaceuticals	Very high	Very long term (>10 years)
2. Nutraceuticals	High	Long term (5+ years)
3. Organic/sustainable food	Very good	Medium term (<5 years)
4. Health and beauty products	Good	Medium term (<5 years)
5. Food	Good	Medium term (<5 years)
6. Aquaculture/animal feed	Quite good	Medium term (<5 years)
7. Biofuels	Lower	Medium term (<5 years)
8. Organic fertilizers	Lower	Medium term (<5 years)
9. Fertilizers	Low	Medium term (<5 years)

Una de les espècies de més interès es l'Ulva (alga verda), s'ha demostrat que funciona eficaçment en sistemes integrats amb espècies alimentades (Neori et al. 2004, Neori et al., 2000). Ulva sp. són eliminadores eficients d'amoni (NH_4^+) (Bracken i Stachowicz 2006) i tenen una morfologia ben adaptada al cultiu amb agitació.

El ràpid ritme de creixement de l'espècie pot ser d'importància per a facilitar el cultiu i per competir amb epífites o altres espècies potencialment invasores. Com que les espècies d'Ulva sovint són intermareals, tenen un alt rang de tolerància a la temperatura i la irradiació.

Ulva està cultivada per al mercat alimentari global, però generalment té un valor inferior a les altres algues vermelles o brunes. Tanmateix, atès que és atractiva i es considera que té un bon valor nutritiu, el màrqueting adequat pot augmentar-ne el valor. Les recerques en el mercat dels aliments (Kirby 2001), afirmen que Ulva sp. conté un 15% de proteïna, 50% de sucre i midó, menys de l'1% de greix, alt contingut en ferro, iode, alumini, manganès, níquel, vitamines A, B1 i C, sodi, potassi, magnesi, calci, nitrogen soluble, fòsfor, clorur, silici, rubidi, estronci, bari, radi, cobalt, bor i oligoelements.

A més, Ulva sp. és adequada com a aliment per a l'orella de mar o els eriçons de mar (Neori et al. 2004, Neori et al., 2000).

1.4. El gènere Ulva

El gènere ulva consta de més de 275 espècies, són algues verdes membranoses que tenen dues capes de cèl·lules que s'uneixen per formar tal·lus laminars. Aquest gènere es caracteritza per un creixement ràpid, tolera molt bé els ambients eutrofitzats amb una elevada taxa de captació d'amoni i capaç de desenvolupar-se en una elevada densitat de cultiu. Tot i això aquest gènere no és cultivat de manera comercial fora d'Àsia, on ho és per al consum humà, ja que no s'ha trobat el lloc adequat en el mercat actual (Gao, 2016).

1.4.1. Aplicacions

Aquest gènere té una gran capacitat d'extreure nutrients i contaminants (Bolton et al., 2009). Per tant pot ser integrat com a biofiltre d'aigües residuals, d'una manera eficient en la bioremediació d'ambients eutrofitzat (Cole et al., 2014). També cal destacar que el gènere Ulva té una gran quantitat d'aplicacions, des de la producció de bioenergia (Neveux et al., 2014) i carbó vegetal (Bird et al., 2011) fins a sucres i carbohidrats d'alt valor per a la indústria alimentària i farmacèutica. En aquesta última destaquen els ulvans, un heteropolisacàrid sulfatat que es troba a la paret cel·lular molt usat com a anticoagulant, antioxidant, antivíric i antitumoral (Magnoni et al., 2017).

1.4.2. Reproducció i cicle de vida:

Les macroalgues marines poden presentar dos tipus de reproducció: asexual o propagació vegetativa i reproducció sexual.

Una mateixa espècie d'alga pot presentar ambdós mecanismes, s'anomena cicles digenètics.

La reproducció asexual consisteix en el despreniment de fragments pluricel·lulars (fragmentació) o be en el despreniment de cèl·lules germinals (esporulació), sent capaces de generar un nou individu pluricel·lular a partir d'una única cèl·lula.

La reproducció sexual consisteix en la fusió de dues cèl·lules especialitzades (gàmetes), provinents d'individus diferents (APROMAR 2014).

Totes les espècies d'ulva tenen un cicle de vida digenètic isomòrfic, alternen entre etapes de vida haploides (gametòfit) i diploide (esporòfit) les quals són morfològicament idèntiques. Els gametòfits produeixen gàmetes haploides biflagel·lats a través de la mitosis, i els esporòfits produeixen espores haploides quadriflagel·lades a partir de la meiosi.

El cicle de vida d'Ulva segueix l'esquema de la Figura 10. Gràcies a les successives mitosis d'un zigot diploide s'acaba formant un esporòfit també diploide, aquests mitjançant la meiosi forma espores haploides que amb successives mitosis esdevindran gametòfits haploides. Aquests generen gàmetes haploides que poden seguir amb la reproducció sexual o canviar a asexual. La fusió d'aquests gàmetes ens dona el zigot diploide on havia començat el cicle (Wichard T., 2015).

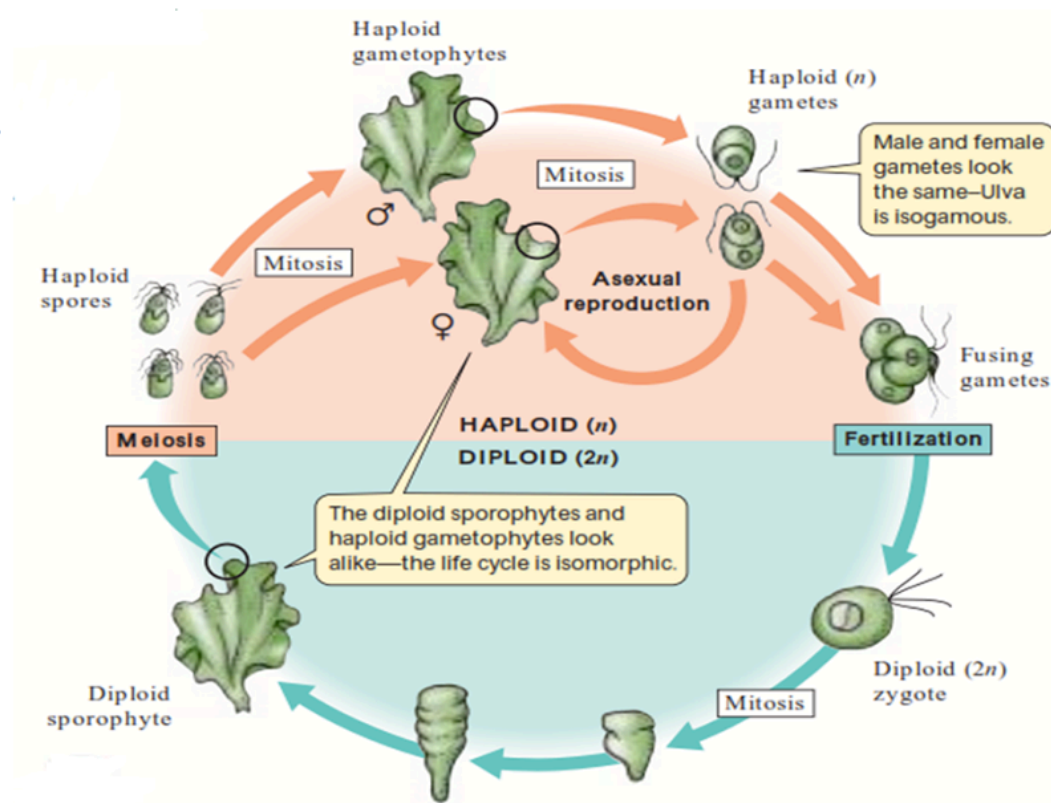


Figura 10. Cicle de vida isomòrfic de *Ulva Lactuca* (Plantscience4u).

1.4.3. Espècies més utilitzades per al cultiu:

Degut al potencial com a aliment, tant humà com animal, biofuel o bioremediació, les diferents espècies d'ulva han sigut cultivades a diverses parts del món en diverses plantes pilot. Entre elles destaquen les espècies *U. Lactuca*, *U. Rigida*, *U. Rotunda*, *U. Pertusa* i *U. Ohnoi* (Gao, 2016). En l'estudi de Casais (2016) aquesta última va estar identificada com una bona candidata al cultiu, els estudis realitzats en morfologia, composició nutricional, productivitat en un sistema de cultiu en suspensió en un tanc i comportament a diferents dosis lumíniques, van concloure que *Ulva Ohnoi* era la millor candidata per a les aplicacions com a biofiltre en sistemes IMTA en recirculació, de les quatre espècies estudiades (Mata et al., 2015). A més a més tot i no ésser una espècie autòctona, es troba a la costa mediterrània tant a Catalunya com a Andalusia. Així doncs la part experimental d'aquest treball va ser realitzada amb la macroalga *Ulva Ohnoi*.

1.5. Factors que influeixen en el creixement d'*Ulva Ohnoi*

A l'hora d'escollir una espècie de macroalga per introduir-la en un sistema IMTA, és essencial que l'espècie seleccionada tingui elevats índexs de creixement ja que generalment repercuteix en la capacitat de bioremediació (Lawton et al., 2013). Per això cal conèixer els factors que influeixen en el creixement d'aquesta. El creixement de les macroalgues es tradueix en variació de la biomassa. Aquesta variació és resultat de la combinació de la reserva interna de nutrients i carboni, els nutrients inorgànics dissolts en el medi, la irradiació i la temperatura (Ren et al., 2014).

El gènere *Ulva*, de les algues verdes, segueix una distribució cosmopolita en diferents climes i condicions ecològiques, així doncs es poden establir un conjunt de factors físics, químics i biològics que afecten el seu creixement (Pedersen et al., 2004). A la vegada, la taxa de creixement d'algues conreades s'ha demostrat que depèn de paràmetres ambientals com ara la temperatura, el subministrament de nutrients, la densitat de cultiu, la irradiació i la salinitat (Lüning, 1990; Lobban i Harrison, 1994). A més, el pH i la disponibilitat de CO₂ pot ser limitant en el creixement d'aquestes (Friedlander i Levy 1995).

1.5.1. Temperatura

La fluctuació de la temperatura produeix un efecte negatiu sobre el creixement, els cultius amb 20±8°C i 20±10°C, redueixen significativament la velocitat de creixement respecte a un cultiu control a una temperatura constant de 20°C. També es va establir el rang òptim per a *Ulva pertusa* a 20±3,69°C (Wang et al., 2007).

Mata et al. (2015) va observar que la producció de *U. Ohnoi* augmenta fins arribar als 28°C però disminueix ràpidament al superar aquest llindar, establint el creixement màxim d'aquesta alga als 27°C, tal i com s'observa a la Figura 11.

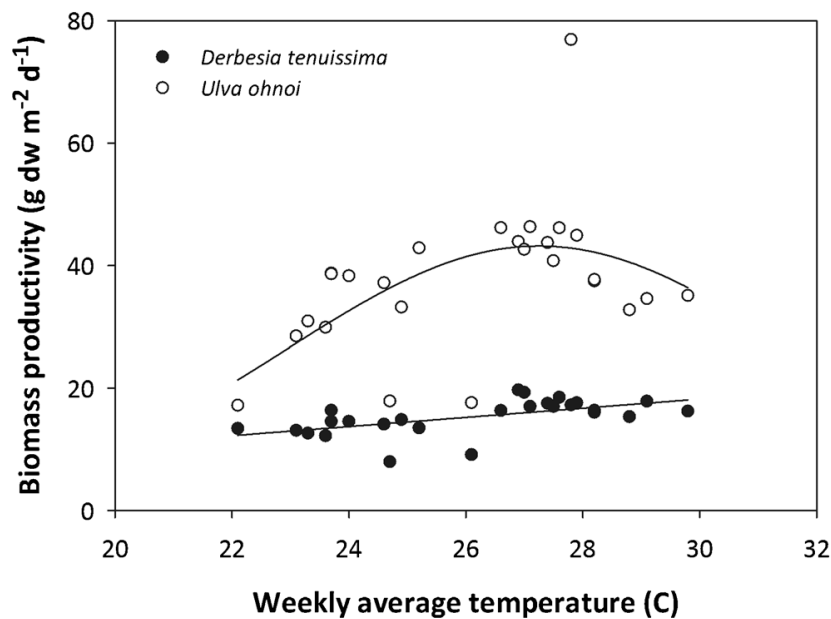
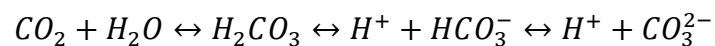


Figura 11. Producció de biomassa d'*Ulva ohnoi* i *Derbesia tenuissima* en front de la temperatura (Mata et al., 2015)

1.5.2. Carboni inorgànic i pH

El creixement de les macroalgues depèn directament de la disponibilitat de carboni inorgànic que hi ha a l'aigua (Zou, 2014). Cal tenir en compte la forma de carboni inorgànic que predomina, ja que totes les algues són capaces d'utilitzar-lo en la forma C-CO₂ però només algunes, com *Ulva sp.*, són capaces d'utilitzar-lo també en forma de HCO₃⁻ (Zou, 2014).

La disponibilitat de CO₂ a l'aigua està estretament relacionada amb el pH d'aquesta, això es degut a l'equilibri que s'indica a continuació (Björk et al., 1993):



La variació del pH desplaça l'equilibri cap a la formació de diòxid de carboni, bicarbonat o carbonat en funció del seu valor, tal i com es mostra a la Figura 12.

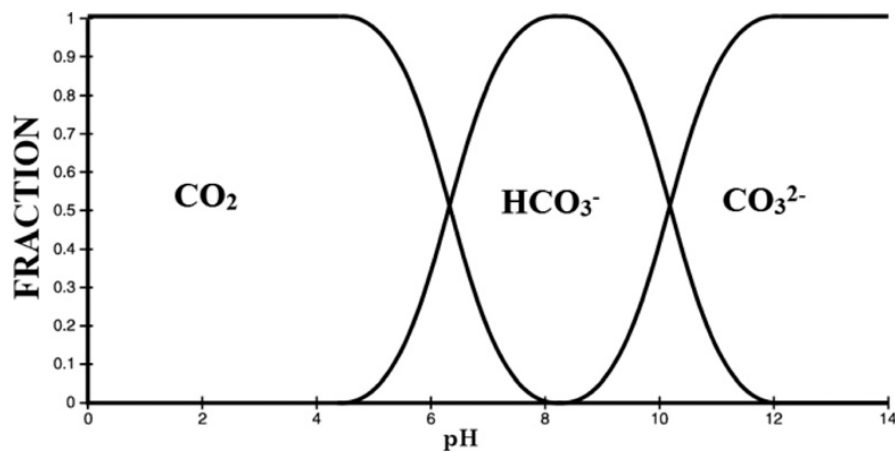


Figura 12. Concentració de diòxid de carboni, bicarbonat i carbonats en funció del pH (Alabi et al., 2015).

Observem que a partir de pH 8 la quantitat de CO_2 és pràcticament nul·la i la forma que predomina és el bicarbonat (HCO_3^-).

En els sistemes IMTA és promou afavorir les sinèrgies entre els diferents organismes que en formen part. Així, per exemple, els peixos tendeixen a acidificar el medi degut a la producció de CO_2 amb la respiració, mentre que les algues en el període diürn consumeixen CO_2 i fan augmentar pH (Menéndez et al., 2001). El punt de compensació de pH, és el valor de pH on el creixement de les algues es veu autoinhibit degut a l'augment del mateix, que desplaça l'equilibri de la Figura 12 cap a la presència única de l'ió carbonat. Per això en les instal·lacions on s'ha dut a terme aquest treball es realitza una addició d'àcid als tancs d'algues per mantenir-los allunyats d'aquest punt i no limitar-ne el creixement.

La limitació de C-CO_2 pot produir entre d'altres reduccions de la taxa fotosintètica, l'alga *Ulva* assoleix la saturació de CO_2 en aigua a pHs inferiors a 8,2 i temperatura de 25 °C (Beer, S. 1994). A tall d'exemple la Figura 13 mostra l'efecte del pH i la disponibilitat de carboni inorgànic en la taxa fotosintètica.

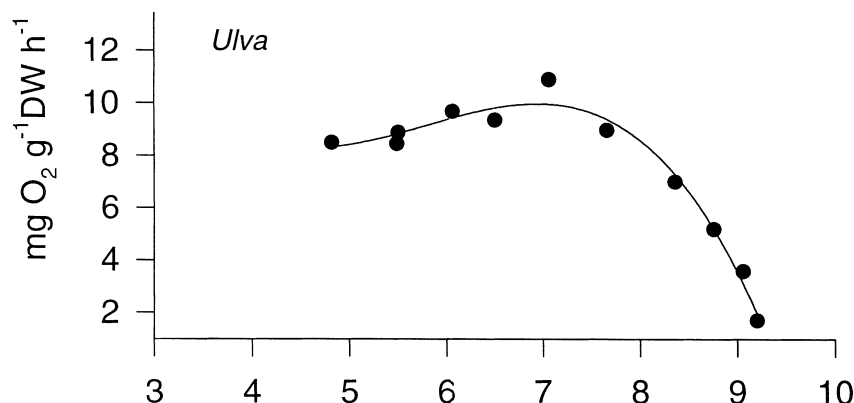


Figura 13. Taxa fotosintètica de l'espècie *Ulva* sp. en front de l'augment de pH (Menéndez et al., 2001).

En augmentar el pH l'equilibri a l'aigua es desplaça de manera que no trobem pràcticament carboni orgànic, fent així que la taxa fotosintètica se'n vegi afectada.

1.5.3. Salinitat

Sovint es troben macroalgues en zones d'aigua estancada, és per això que han de suportar canvis relativament bruscos en la salinitat durant un període de temps curt. Aquests canvis ràpids poden tenir efectes marcats sobre el creixement de les macroalgues. Algunes espècies d'*Ulva* s'han adaptat a aquest tipus d'entorn i tenen una tolerància a la salinitat que va des de concentracions de 3 a 115 g/L (Lobban i Harrison, 1994).

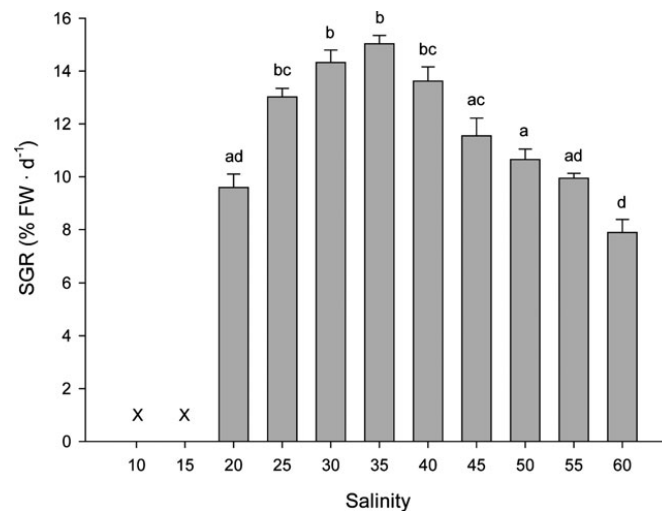


Figura 14. Taxa específica de creixement (SGR) de *Ulva ohnoi* cultivada a diferents salinitats expressada en g/L (Angell et al., 2015)

Tot i la tolerància a un rang ampli de salinitat, tal i com s'observa a la Figura 14 l'*Ulva ohnoi* presenta el seu màxim creixement a una salinitat de 35 g/L (Angell et al., 2015).

1.5.4. Irradiància, densitat de cultiu i fotoperíode

Cada espècie de macroalga té uns requisits mínims i màxims d'irradiància per al creixement. Però a la vegada aquests depenen de la manera de cultiu d'aquestes. En condicions de laboratori on la macroalga creix en una placa de petri o en uns volums de líquids molt reduïts, la necessitat de llum és inferior, ja que no hi ha competència i la irradiància que arriba a l'alga és constant. En aquestes condicions *Ulva sp.* té el mínim per sota de 35 $\mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de radiació PAR i entre 35 i 80 $\mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ no hi ha restriccions de creixement (Duke et al., 1986).

En canvi, quan es treballa en tancs de volums més grans, la competència per la llum de les algues es fa més important a causa del "self-shading" o auto-ombreig degut a l'agitació, així doncs ens cal treballar amb unes irradiàncies més elevades. S'ha observat que entre 200-500 $\mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ es troba un rang òptim d'irradiància (Figura 15).

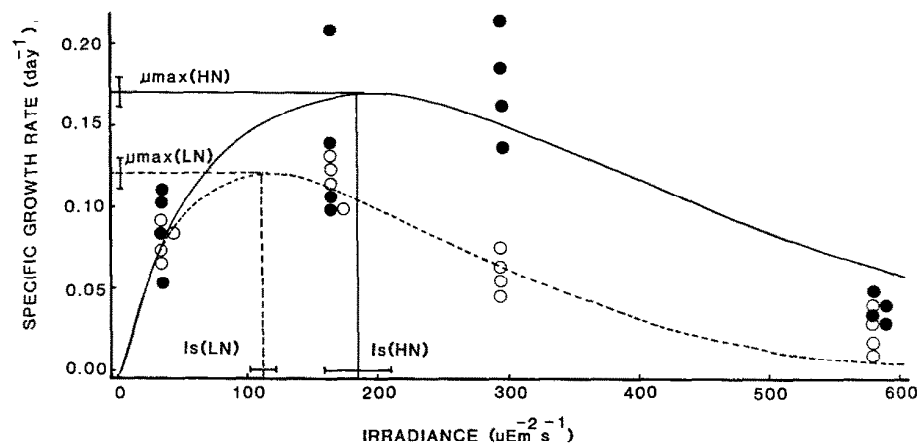


Figura 15. Taxa de creixement específic de *Ulva curvata* en funció de la irradiància per elevats continguts de nutrients (HN) i baix contingut de nutrients (LN) (Coutinho and Zingmark, 1993).

Coutinho and Zingmark (1993) estableixen, en *Ulva curvata*, que a partir de 500 μmol fotons m⁻² s⁻¹, es comencen a veure els afectes de la fotoinhibició, cosa que pot arribar a provocar una baixada significativa de la velocitat de transport de la cadena d'electrons (Longstaff et al., 2002).

Quan les macroalgues es cultiven en tancs, una densitat de cultiu òptima maximitza el rendiment a l'hora de captar la llum i els nutrients si aquests en són limitants (Neori et al., 2004). La influència de la densitat de cultiu en el creixement de les algues es fonamenta bàsicament en l'auto-ombreig, que fa que la distribució de la llum dins del tanc sigui molt heterogènia i que augmenti el gradient del flux de fotons al augmentar la distància a la superfície lliure de l'aigua (Hernández et al., 2005).

L'equació de Lambert-Beer ens mostra com la irradiació a una determinada profunditat, segueix una exponencial decreixent:

$$I(z) = I_0 \cdot \exp\{-(K_0 + K_{ext} \cdot B) \cdot z\}$$

On I_0 és la irradiància incident a la superfície lliure del tanc, K_0 és el coeficient d'extinció de la llum degut a l'aigua, K_{ext} és el coeficient d'extinció de la llum degut a la biomassa, B és la quantitat de biomassa per unitat de volum i z la profunditat respecte la superfície lliure de l'aigua.

Aquesta equació ens permet entendre la correlació entre la intensitat i la densitat de cultiu. Una major densitat implica un major gradient de l'extinció de llum amb la qual cosa necessitem una irradiància major, es per això que ha d'existir un equilibri entre aquests dos paràmetres.

Quan la densitat de cultiu es baixa, la producció va en augment, tenint creixements elevats. La producció passa per un màxim que portat a regim estacionari seria la densitat de cultiu òptima.

Una bona eina per conèixer les condicions lumíniques d'una alga es saber el seu contingut en clorofil·la. Com podem veure a la Figura 16, aquest té una relació inversa amb la irradiació. Per tant un baix contingut en clorofil·la ens indicarà restriccions en la captació de llum i viceversa.

Un menor contingut de clorofil·la implica una K_{ext} menor ja que l'alga deixarà passar més llum, així doncs el contingut en clorofil·la també és un paràmetre important a tenir en compte.

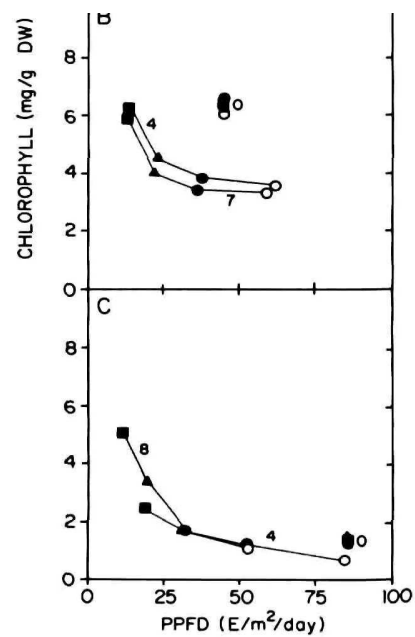


Figura 16 . Contingut en clorofil·la total de *Ulva curvata* en funció de la densitat de flux de fotons fotosintètics (Duke et al., 1986).

A més a més de tenir en compte la irradiància i la densitat de cultiu, cal conèixer l'efecte del fotoperíode, descrit com el cicle de llum-fosc durant 24 hores. De manera general quantes més hores de llum major és el creixement. Sempre i quant es mantingui un equilibri amb la irradiació i la densitat de cultiu, com s'ha explicat anteriorment. Certs autors reconeixen que les macroalgues, al contrari que les microalgues, necessiten un període de "descans lumínic" per poder restaurar les estructures captadores de fotons danyades (Huang and Rorrer, 2002).

1.5.5. Nutrients

Els nutrients més estudiats i importants per al creixement de les macroalgues són nitrogen i fòsfor els quals es troben en diverses formes.

L'amoni (NH_4^+) i el nitrat (NO_3^-) són les principals fonts de nitrogen de les macroalgues al seu hàbitat natural i s'utilitzen com aliment en els sistemes d'aquicultura multitròfica integrada (Copertino et al., 2008). El nitrogen en forma amoniacal és el residu dissolt més important generat per la producció de peixos en sistemes oberts, en canvi en els sistemes amb recirculació predomina en forma de nitrat.

L'amoni, el qual pot ser tòxic per algunes espècies d'algues en concentracions superiors a 30-50 μM , és la forma preferida d'*Ulva* (Lobban and Harrison, 1994). El nitrogen forma part de les proteïnes i els nucleòtids de la biomassa.

El fòsfor a l'aigua marina es troba sobretot en forma de fosfat (PO_4^{3-}) el qual, igual que el nitrogen, és essencial en el creixement de les macroalgues i pot arribar a ser limitat en el mar a la primavera, ja que es troba en molt baixes concentracions. Aquest forma part de molts intermedis metabòlics, lípids, enzims i altres compostos bioquímics.

1.5.6. Agitació

Independentment del mètode d'agitació utilitzat, la importància d'aquesta recau en la velocitat relativa de l'aigua, es a dir, la velocitat del fluid respecte les algues (ja que també es troben en moviment).

Quan un fluid passa per la superfície d'un cos submergit, existeix una condició essencial: la velocitat del fluid a qualsevol punt de la superfície es zero. Això fa que les regions de fluid properes a aquest cos vegin afectada la seva dinàmica, aquesta regió es denomina capa límit. Dins d'aquesta capa la velocitat del fluid passa del seu valor a zero.

El gruix d'aquest capa disminueix al augmentar la velocitat del fluid (augmenta el número de Reynolds), qual cosa accelera l'entrada de nutrients a l'alga i l'eliminació de l'excés d'oxigen del seu voltant (Msuya and Neori, 2008). Es a dir, l'agitació contribueix a afavorir l'intercanvi de nutrients entre l'aigua i les macroalgues, augmentant el número de Reynolds i reduint el gruix de la capa límit.

1.6. Objectius

Aquest treball forma part d'un projecte del grup de recerca SPAq de la Univers Politècnica de Catalunya que te com a objectius contribuir a la millora de l'eficiència de les instal·lacions productores de macroalgues associades a un sistema d'aqüicultura multitròfica integrada amb recirculació. Per aquest treball, s'ha establert el següent objectiu específic com a columna central de la investigació:

- Determinar la influència del mètode d'agitació a diferents nivells de disponibilitat de nutrients, en el creixement de l'alga i la seva capacitat de bioremediació.

2. Materials i mètodes

2.1. Dispositiu experimental

Les instal·lacions on s'han realitzat els diferents experiments esta emplaçada a l'interior de l'Escola Superior d'Agricultura de Barcelona, al campus del Baix Llobregat de la Universitat Politècnica de Catalunya. La Instal·lació conté les següents parts:

- Esquema de la instal·lació:

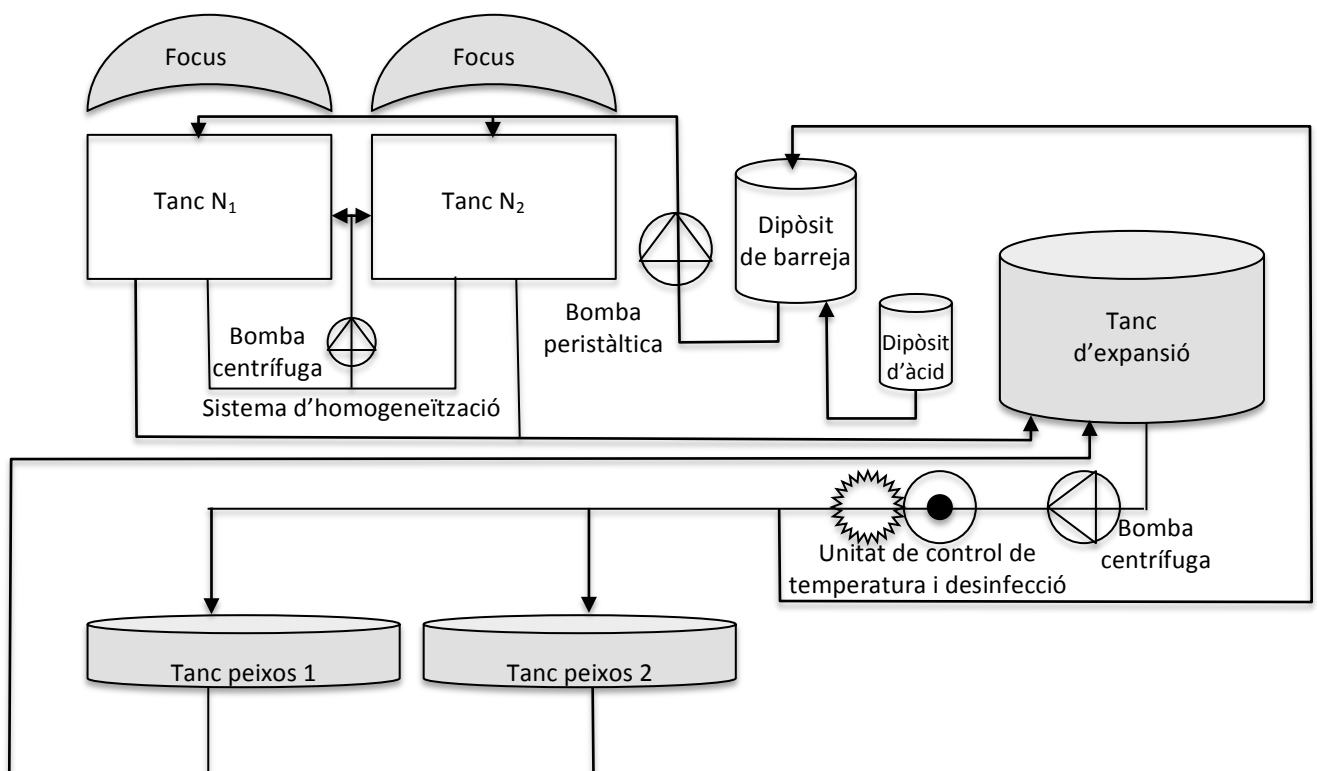


Figura 17. Esquema de la instal·lació on van ser realitzats els diversos experiments.

A la Figura 17 trobem l'esquema funcional de la planta on s'ha realitzat el treball experimental, els seus components estan explicats a continuació.

- **Tancs de peixos:**

La instal·lació consta de dos tancs de peixos, llenguados (*Solea senegalensis*), la massa total dels quals es de 21 Kg. Els tancs són circulars, de diàmetre interior 1m i alçada d'aigua de 25 cm. Estan dotats de sistema d'aeració i un cabal d'entrada de 400 L h⁻¹.

idèntics

- **Tancs N₁ i N₂ d'algues:**

Són dos tancs, semi-cilíndrics col·locats horitzontalment, amb una secció de 76x76 cm, que ens aporta una capacitat de 172 L. Cada tanc té el seu respectiu sistema d'il·luminació. Aquest disseny de tanc ens permet realitzar l'agitació, de les macroalgues (*Ulva ohnoi*), mitjançant aeració inferior o bé per jets d'aigua entrant al tanc. La sortida de l'aigua dels tancs es realitza mitjançant dos orificis situats a la part superior, aquests protegits per una malla que evita que la macroalga surti del tanc. Els dos orificis s'ajunten gràcies a un tub per on surt l'aigua i puja fins un colze que ens permet regular el nivell d'aigua del tanc. Quan puja el nivell, comença a vessar aigua pel colze i circula cap al tanc d'expansió, per reprendre el circuit.

- **Il·luminació:**

El sistema d'il·luminació està format per tres barres LEDS, a cada tanc, rectangulars de 50 W cadascuna, col·locades sota una campana reflectora. La distribució de la llum en la superfície del tanc expressada com a densitat de fotons fotosintèticament actius incidents a la superfície del tanc expressats en mmol·m⁻²·s⁻¹ es mostra en la Figura 18.

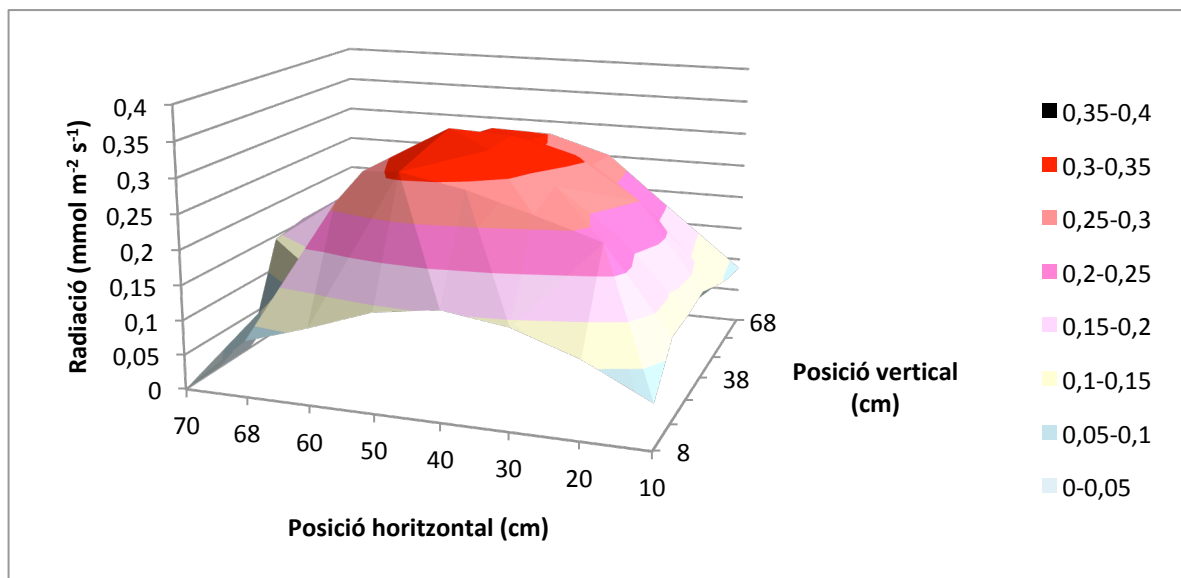


Figura 18. Caracterització en superfície dels focus usats als tancs d'algues.

- **Tanc d'expansió:**

És l'element central de tota la instal·lació, rep l'aigua de sortida dels tancs d'algues i peixos, alhora la recircula cap als tancs de peixos i el dipòsit de barreja. És un tanc cilíndric amb diàmetre interior de 80 cm i alçada d'aigua de 60 cm. Al seu interior es troba el biofiltre, element essencial per a un sistema RAS, com ja s'ha explicat anteriorment, aquest gràcies als bacteris que conté, oxida el NH_4^+ procedent dels tancs dels peixos a NO_3^- .

- **Dipòsit d'àcid:**

Conte una solució d'àcid clorhídric de concentració 0,117M, que ens ajuda a controlar i assegurar la disponibilitat de carboni, en forma de CO_2 , als tancs d'algues.

Com s'ha explicat anteriorment això es produeix gràcies al desplaçament de l'equilibri del carboni a l'aigua cap a la formació de C-CO_2 , degut a la disminució del pH.

- **Dipòsit de barreja:**

És un dipòsit intermedi que rep l'aigua del tanc d'expansió i la distribueix cap als tancs d'algues (N_1 i N_2). És en aquest dipòsit on es fa la mescla amb la solució d'àcid clorhídric, gràcies a una injecció automàtica. Té un sistema de boia que permet bloquejar l'entrada d'aigua quan aquesta arriba a una certa alçada.

- **Sistema d'homogeneïtzació:**

Conjunt format per una bomba i tubs que ens permet intercanviar l'aigua d'ambdós tancs d'algues per assegurar una alta taxa de recirculació per a garantir una qualitat d'aigua homogènia.

- **Unitat de desinfecció:**

Aquesta fa circular l'aigua per sota d'una llum ultraviolada, que permet eliminar els agents patògens que hagin pogut arribar a la instal·lació.

- **Unitat de control de temperatura:**

Degut a les fluctuacions de temperatura durant l'any a les instal·lacions, es necessari controlar la temperatura de l'aigua, que gràcies a un intercanviador de plaques es manté a 19 ± 1 °C.

2.2. Disseny experimental

Per tal d'assolir els objectius plantejats es van realitzar tres experiments.

En tots ells comptàvem amb dos tancs d'algues N1 i N2, amb un fotoperíode de 12 hores de llum al dia i es mantenien a una densitat de cultiu de $0,7 \text{ Kg m}^{-2}$.

Per assegurar que no hi havien diferències entre la qualitat de l'aigua d'ambdós tancs; una bomba barrejava i recirculava l'aigua dels dos tancs en un circuit tancat a raó de més de 3 intercanvis per hora (sistema d'homogeneïtzació Figura 19).

A l'inici de cada experiment es va barrejar l'alga dels dos tancs a parts iguals per assegurar que partíem de biomassa en les mateixes condicions.

La durada dels experiments va ser de 3 setmanes cadascun.

2.2.1. Comparació de dos mètodes d'agitació en condicions d'excés de nutrients.

En aquest primer experiment el tanc N1 estava agitat per un sistema d'aeració submergida, proporcionant un elevat nivell de turbulència. L'agitació del tanc N2 era produïda per jets d'aigua entrant al tanc, produint una menor turbulència però un volteig més homogeni (Figura 19).

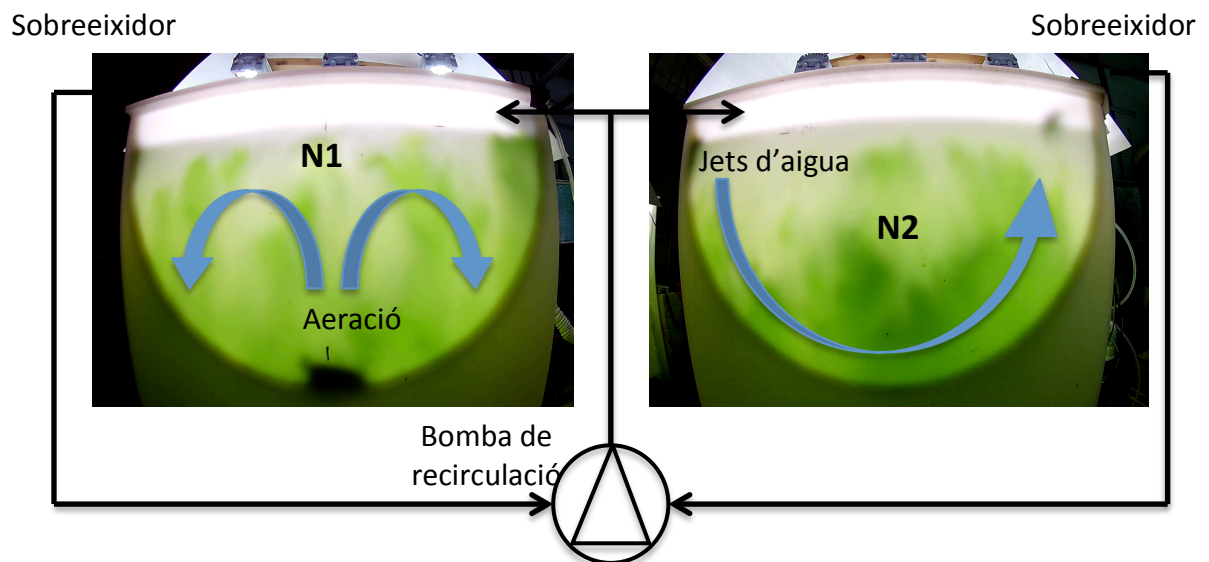


Figura 19. Secció transversal dels tancs d'algues N1 i N2 amb l'esquema del sistema d'homogeneïtzació i representació del seu sistema d'agitació.

Per garantir les condicions d'excés de nutrients s'entraven 28.2 L/h d'aigua provinent dels peixos a cada tanc, durant 12 hores al dia (les hores de llum). Això corresponia a una carrega nutritiva diària de 5,51 grams de nitrogen i 0,22 de fòsfor.

Per tal d'obtenir la taxa de creixement específic (SGR) i mantenir els tancs a la densitat de cultiu es pesaven les algues dos cops per setmana. El contingut de clorofil·la va ser mesurat el primer i últim dia de l'experiment.

Els contingut en nitrogen orgànic i fòsfor de les algues van ser analitzats puntualment per conèixer l'efecte de les condicions.

Mostres puntuals d'aigua dels tancs eren recollides tres cops per setmana, per ser analitzades i comprovar que el contingut en nutrients d'aquesta no era limitant.

En aquest experiment, la concentració de nutrients és molt alta i, gràcies a la bomba de recirculació, idèntica als dos tancs. Per aquesta raó, si apareixen diferències en la taxa de producció de biomassa o en la concentració de clorofil·la, aquestes hauran de ser atribuïdes a una major eficiència en l'aprofitament de la llum incident, molt probablement derivada del mètode d'agitació (Msuya and Neori, 2008).

2.2.2. Comparació de dos mètodes d'agitació en condicions de dèficit de nutrients.

En aquest experiment el tanc N1 estava agitat per un sistema de aeració submergida, proporcionant un elevat nivell de turbulència. L'agitació del tanc N2 era produïda per jets d'aigua entrant al tanc, produint una menor turbulència però un volteig més homogeni.

Per garantir les condicions de dèficit de nutrients únicament s'entraven 2 L/h d'aigua provinent dels peixos a cada tanc, durant 12 hores al dia (les hores de llum). Això corresponia a una carrega nutritiva diària de 0,48 grams de nitrogen i 0,02 de fòsfor.

Per tal d'obtenir la taxa de creixement específic (SGR) i mantenir els tancs a la densitat de cultiu es pesaven les algues dos cops per setmana. Es comparava els continguts de clorofil·la inicial i final, per qual cosa se'n feia l'anàlisi el primer i últim dia de l'experiment.

Els contingut en nitrogen orgànic i fòsfor de les algues van ser analitzats puntualment per conèixer l'efecte de les condicions.

Mostres puntuals d'aigua dels tancs eren recollides tres cops per setmana, per ser analitzades ,conèixer el seu contingut de nutrients i determinar el seu caràcter limitant.

En aquesta situació, la hipòtesis establerta és que en condicions de dèficit de nutrients, la turbulència en l'agitació de les algues afavorirà la captació de nutrients, gràcies a la reducció del gruix de la capa límit.

2.2.3. Comparació entre diferents cabals d'aeració.

En aquest últim experiment volíem conèixer l'efecte d'un cabal d'agitació notòriament inferior.

Tots dos tancs estaven agitats per un sistema de aeració submergida. El tanc N1 era agitat amb un cabal de 8 L min^{-1} , en canvi el tanc N2 era agitat amb un cabal de 4 L min^{-1} . Es va fer una estimació de la velocitat de rotació de les algues als cabals esmentats. Va donar els següents valors 3,87 i 3,03 rpm respectivament. El procediment per determinar-los s'explica en el següent apartat.

Per garantir les condicions òptimes de nutrients i que no fossin un factor limitant, s'entraven 28.2 L/h d'aigua provinent dels peixos a cada tanc (EN), durant 12 hores al dia (les hores de llum).

Per tal d'obtenir la taxa de creixement específic (SGR) i mantenir els tancs a la densitat de cultiu es pesaven les algues dos cops per setmana. Es comparava els continguts de clorofil·la inicial i final, per qual cosa se'n feia l'anàlisi el primer i últim dia de l'experiment.

Els contingut en nitrogen orgànic i fòsfor de les algues van ser analitzat puntualment per conèixer l'efecte de les condicions. Aconseguint una carrega diària de $3,66 \text{ g}$ de nitrogen i $0,16 \text{ g}$ de fòsfor.

Mostres puntuals d'aigua dels tancs eren recollides tres cops per setmana, per ser analitzades i comprovar que el contingut en nutrients d'aquesta no era limitant.

Experiment	Nutrients	Qin (L/h)	Tanc	Tipus d'agitació	N (ppm)	P (ppm)	g N/dia	g P/dia
1	HN	28.2	N1	Aeració submergida	$16,29 \pm 1,03$	$0,65 \pm 0,16$	5,51	0,22
			N2	Jets d'aigua				
2	LN	2.0	N1	Aeració submergida	$20,05 \pm 3,12$	$0,80 \pm 0,22$	0,48	0,02
			N2	Jets d'aigua				
3	HN	28.2	N1	Alta aeració submergida	$10,81 \pm 4,67$	$0,46 \pm 0,21$	3,66	0,16
			N2	Baixa aeració submergida				

Taula 1. Taula resum dels experiments realitzats, tipus d'agitació, cabal d'entrada als tancs d'algues (Qin), concentracions de N i P als tancs de peixos, N i P (g/dia) que entra als tancs d'algues. HN vol dir "high nutrients" i LN "low nutrients".

2.3. Mètodes analítics i càlculs

Per tal d'obtenir uns resultats quantitatius que permetessin assolir els objectius plantejats, s'han realitzat un seguit de determinacions i càlculs.

2.3.1. Determinació del creixement i pes sec:

Dos cops per setmana (dilluns i dijous) s'extreien les algues dels tancs per ser centrifugades, aproximadament a 600 rpm durant uns 15 segons 2 o 3 vegades. A continuació es pesava per tal d'obtenir el pes fresc, després es retornava al tanc la quantitat d'alga necessària per arribar a la densitat de cultiu establerta. L'excedent correspon al creixement de l'alga.

Per determinar el pes sec s'apuntava el pes dels sobrant i es rentava amb aigua destil·lada per eliminar l'excés de sal a la superfície de les algues, el pes s'apunta abans del rentat ja que degut a aquest les algues guanyen pes com a conseqüència de l'efecte osmòtic. A continuació es posava a assecar la mostra durant un mínim de 24 hores a 60°C, per eliminar tot el contingut d'aigua de les mostres (cal deixar les mostres al dessecador uns minuts per tal d'evitar que absorbeixin la humitat de l'ambient). Podent expressar el creixement en pes sec, eliminant el possible error degut a les diferències de contingut d'aigua que tenen les macro algues després del centrifugat manual. Per fer ho cal fer la relació entre el pes de la mostra posada a assecar i el pes després d'assecar:

$$r = \frac{Pf_{fresc}}{P_{sec}}$$

On: r és la relació entre ambdós pesos, que ens serveix per convertir el pes fresc en sec d'una mateixa mostra. Pfresc és el pes de l'alga abans de posar a l'estufa i Psec el pes al sortir-ne.

2.3.2. Càlcul de la productivitat i taxa de creixement específic (SGR):

El creixement de les algues es calcula a partir de la següent equació:

$$Productivitat (g \cdot d^{-1}) = \frac{Pf - Pi}{t}$$

On: Pf és el pes final, Pi el pes inicial i t el temps transcorregut.

Per obtenir el creixement per unitat de superfície hem de dividir entre la superfície, obtenint la següent equació:

$$Productivitat \text{ per unitat de superfície } (g \cdot d^{-1} \cdot m^{-2}) = \frac{Pf - Pi}{t \cdot S}$$

On: S és la superfície.

L'increment de biomassa per unitat de massa d'alga i dia, ha estat calculat amb el %SGR (adimensional):

$$\%SGR = \frac{(\ln Pf - \ln Pi)}{t} \cdot 100$$

Aquests càlculs es poden realitzar tant utilitzant el pes fresc com el pes sec.

2.3.3. Anàlisi mostres d'aigua:

De les mostres d'aigua es quantificava el NO_3^- i el P per obtenir informació dels nivells de nutrients, a l'aigua, i la captació d'aquests per part de les algues.

Determinació del contingut de nitrats a l'aigua.

Per la determinació del contingut de nitrats a l'aigua utilitzem el mètode el *Ultraviolet Spectrophotometric Screening Method* (4500- NO_3^-) descrit al *Standard Methods* (APHA,1992) que és un mètode adequat per aigües amb baix contingut de matèria orgànica. Aquest mètode es basa en l'absorció de l'ió nitrat a l'ultraviolat, a 220nm. L'absorció de la matèria orgànica es compensa amb la lectura a 275nm.

La mostra es filtra per eliminar la interferència de partícules en suspensió i per reduir l'error en la lectura que puguin causar els hidròxids i carbonats s'acidifiquen les mostres. La linealitat es manté fins a 11 mg/L N- NO_3 .

Material:

- Matrassos aforats de 50mL.
- Pipetes de 1,2,5,10,20 i 25mL.
- Pera de goma.
- Xeringa de 10-50mL amb filtres de membrana amb un diàmetre de porus de 0,45 μm .
- Espectrofotòmetre.
- Aigua desionitzada.

Reactius:

- Solució mare de nitrats de 100 mg/L N- NO_3 . Per prepara-la es pesen 0.7218g de KNO_3 (assecat 1h en estufa a 105°C) i es dissol en un litre d'aigua desionitzada.
- Solució intermèdia de 10 mg/L N- NO_3 . Per prepara-la es fa una dilució 1/10 de la solució mare. Es congela en vasos de 100mL.
- Àcid clorhídric (HCl) 1M. Per preparar-lo mesurem 41,44 mL de HCl concentrat (37% i 1,19g/mL) i diluïm fins a 500mL amb aigua desionitzada.

Procediment:

Aquest mètode es pot dividir en quatre parts:

1. Preparació dels patrons.

Per aconseguir una recta patró, a partir de la qual es determina la concentració de les mostres, necessitem preparar els set patrons de 0,2; 0,4; 0,8; 1; 2; 4 i 5 mg/L N- NO_3 . A partir de la solució intermèdia de 10 mg/L N- NO_3 i aigua desionitzada es preparen els patrons. Es pipetegen 1, 2, 4, 5, 10, 20 i 25mL de 10 mg/L N- NO_3 en matrassos aforats de 50mL i s'enrasa. Tot seguit afegim 1mL de HCl 1M. Els patrons així preparats es poden guardar congelats en tubs d'assaig de 10mL i descongelar per l'anàlisi.

2. Preparació de les mostres.

Un cop recollides les mostres s'han de filtrar amb un filtre de membrana amb un diàmetre de porus de 0,45 µm. Depenent de la concentració esperada s'han de diluir les mostres perquè estiguin dins del rang de la recta patró, fins a 5ppm. En el nostre cas alguna mostra podria superar el rang i per tant sempre fem una dilució 1/5, és a dir 10 ml de mostra s'enrasen en un aforat de 50mL amb aigua desionitzada. Tot seguit afegim 1mL de HCl 1M.

3. Lectura dels patrons i les mostres.

Primer es mesura un blanc amb aigua desionitzada, a les dues cubetes, per tal d'ajustar el zero d'absorbància. Tot seguit es fan les lectures, per duplicat dels patrons i per triplicat les mostres, amb un espectrofotòmetre que ens permet llegir dues longituds d'ona (220nm i 275nm) a la vegada. La lectura de 220nm es realitza perquè aquesta longitud és absorbida tant per N-NO₃ com per la matèria orgànica i la lectura de 275nm només és absorbida per la matèria orgànica i gràcies a això podem trobar l'error introduït per la matèria orgànica que pugui haver en la mostra restant a la absorbància de 220nm la de 275nm.

4. Càlculs.

Un cop obtingudes les lectures de les mostres i els patrons, introduïm les dades a l'Excel. Primer apliquen el factor de correcció de la matèria orgànica, restant dues vegades la lectura de 275 nm al valor obtingut a la lectura de 220 nm.

$$\lambda N - NO_3 = \lambda(220) - 2 \cdot \lambda(275)$$

Tot seguit es dibuixa la recta patró amb les lectures dels patrons i a partir d'aquesta, afegint la línia de tendència, obtenim l'equació de la recta i amb la regressió sabem si aquesta és vàlida. Finalment, amb l'equació de la recta, i multiplicant pel factor de dilució, obtenim les concentracions de N-NO₃ en mg/L.

Determinació del contingut de fòsfor a l'aigua.

El mètode utilitzat per determinar la concentració de fòsfor en les mostres és el *Determination of Dissolved Inorganic Phosphate* descrit a *Methodsof SeawaterAnalysis* (Grasshoff et al.,1999).

Material:

- Matrassos aforats de 50mL de coll llarg.
- Pipetes de 1, 2, 5 i 10mL.
- Pera de goma.
- Filtres de membrana amb un diàmetre de porus de 0,45 µm.
- Espectrofotòmetre.

Reactius:

- Aigua desionitzada.
- H_2SO_4 4,5M. Per preparar-lo mesurem 249,8 mL de H_2SO_4 concentrat (96% i 1,84g/mL) i enrasem fins a 1L amb aigua destil·lada.
- Solució reductora: Per preparar la solució reductora afegim 5 g de àcid ascòrbic ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) en 25 mL d'aigua destil·lada i afegim 25 mL d'àcid sulfúric(H_2SO_4)4,5 M. Aquesta solució es pot conservar a la nevera fins que agafi tonalitats groguenques (aproximadament 1 setmana).
- Cromogen: Per preparar-lo es dissolen 12,5 g de heptamolibdat d'amoni tetrahidratat ($(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$) en 125 ml d'aigua destil·lada (solució 1) . A part dissolem 0,5 g de tartrat d'antimoni i potassi ($\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$)en 20 ml d'aigua destil·lada (solució 2) . Finalment afegim primer la solució 1 i després la solució 2 a 350ml d'àcid sulfúric 4,5M agitant contínuament.
- Solució mare de 100 ppm P: Per preparar-la dissolem 0,439g de KH_2PO_4 (assecat a l'estufa 1hora a 105oC) en 1 L d'aigua desionitzada. S'ha de conservar a la nevera.
- Solució intermèdia de 20ppm P: Per preparar-la afegim 20mL de solució mare i enrasem a 100mL amb aigua desionitzada. S'ha de conservar a la nevera.

Procediment:

Aquest mètode es pot dividir en quatre parts:

1. Preparació dels patrons.

Per aconseguir una recta patró, a partir de la qual es determina la concentració de les mostres, necessitem preparar els patrons de 0,1; 0,2; 0,5 i 1 mg P/L i un blanc amb aigua desionitzada. Els preparem amb una solució de 5 ppm que l'obtenim afegint 25mL de la solució intermèdia de 20ppm P i enrasant en un matràs de 100mL amb aigua desionitzada. A partir d'aquesta i aigua destil·lada es preparen els patrons pipetejant 1,2,5 i 10mL de la solució de 5ppm en aforats de 50mL i enrasant amb aigua desionitzada.

2. Preparació de les mostres.

Un cop recollides les mostres s'han de filtrar amb un filtre de membrana amb un diàmetre de porus de 0,45 μm per tal de reduir al màxim l'error de les partícules en suspensió que puguin haver en les mostres al fer la lectura.

3. Lectura dels patrons i les mostres.

En els matrassos aforats de 50mL on tenim els patrons i les mostres, les quals no estan diluïdes, afegim 1 mL de solució reductora i agitem. A continuació afegim 1 mL de reactiu cromogen i tonem a agitar. Un cop fet això esperem 10minuts. El blanc no ha de desenvolupar color i serveix per omplir les dues cubetes de referència i fer l'autozero. Un cop fet això llegim primer per duplicat cada patró i tot seguit per triplicat cada mostra a 880nm.

4. Càlculs.

Un cop obtingudes les lectures dels patrons i les mostres, introduïm les dades a l'Excel. Tot seguit es dibuixa la recta patró amb les lectures dels patrons de 0,1; 0,2; 0,5 i 1 mg/L P i a partir d'aquesta, afegint la línia de tendència, obtenim l'equació de la recta i amb la regressió sabem si aquesta és vàlida. Finalment, amb l'equació de la recta, obtenim les concentracions de P en mg/L tal.

2.3.4. Determinació del contingut de clorofil·la i carotens a l'alga:

El mètode ha estat basat en el treball de Henriques et al., 2007.

Material:

- Morter.
- Pipetes de 1, 3 i 5 ml.
- Puntetes de pipeta.
- Pinces.
- Tubs de centrifuga (tants com mostres).
- Nevera.
- Parafilm.
- Paper d'alumini.
- Balança analítica.
- Centrifuga.
- Espectrofotòmetres.

Reactius:

- Metanol.

Procediment:

Aquest mètode es pot dividir en tres parts:

1. Extracció.

Primer de tot cal netejar l'alga 3 cops amb aigua destil·lada, eixugar-la bé amb paper secant i pesar 0,5g de mostra per repetició.

Seguidament es dur a terme l'extracte de cada repetició. Cal posar l'alga al morter amb mitja cullerada de sorra, afegir 5 ml de metanol i aixafar fins a fragmentar bé tota la mostra. Netejar la mà de morter amb 2 ml de metanol. Abocar l'alga (amb l'ajut de les pinces), metanol i sorra al tub de centrifuga, esbandir el morter amb 5 ml de metanol i abocar-ho al tub de centrifuga.

Tapar el tub amb parafilm i cobrir-lo amb paper d'alumini per evitar el contacte amb la llum. Guardar durant 24 hores a 4°C.

2. Lectura de l'extracte:

Centrifugar durant 5 minuts a 5000 rpm (4°C), posar 3 ml de l'extracte a la cubeta i llegir amb l'espectrofotòmetre a les longituds d'ona de 666, 653 i 470, el blanc el fem amb metanol.

3. Càlcul:

Càlcul del contingut de clorofil·la a (C_a), b (C_b) i carotens (C_{x+c}) amb les fórmules de Lichtenthaler i Wellburn.

$$\begin{aligned} C_a &= 15,65A_{666} - 7,34A_{653} \\ C_b &= 27,05A_{653} - 11,21A_{666} \\ C_{x+c} &= \frac{1000A_{470} - 3,86C_a - 129,2C_b}{245} \end{aligned}$$

El resultat obtingut te la unitat de microg/ml però ho podem passar a microg/gFW, ja que coneixem la massa exacte de la mostra.

2.3.5. Anàlisi mostra seca per a la determinació del nitrogen orgànic:

El contingut en N-orgànic és una mesura indirecta del contingut en proteïna de l'alga. Si es considera que, com a mitjana, 100 g de proteïna contenen 16 g de N, es pot transformar el contingut de N orgànic en proteïna multiplicant per 6.25.

Material.

- Digestor.
- Tubs Kjeldhal.
- Destil·lador.
- Material de vidre per volumetries.
- Paper de fumar.
- Balança analítica

Reactius.

- H_2SO_4 concentrat (riquesa: 96% p/p ; densitat (p/v): 1,84 g/mL.
- Pastilles de catalitzador Kjeldal,
- HCL 0,1 M
- NaOH 0,1 M normalitzada.
- Roig de metil

Procediment.

Aquest mètode es pot dividir en quatre parts:

1. Digestió:

Es pesen, amb la balança analítica 0,2500g de mostra seca i molturada.

S'embolica la mostra amb paper de fumar per tal de poder transportar-la fins al tub Kjeldhal i evitar pèrdues d'aquesta. S'introdueix el paquet en el tub Kjeldhal de 100mL i s'hi afegia una pastilla de catalitzador i 7mL de H_2SO_4 concentrat des del dosificador, remenar el tub fins que es mulla tota la mostra. Es posa a digerir tot el contingut del tub Kjeldhal al digestor durant 1 hora a 400°C.

Aquesta etapa s'ha de realitzar sota la campana amb la vitrina tancada ja que es produeixen molts vapors de diòxid de sofre, l'aixeta té una trompa de buit connectada a una tapa que dissol en aigua part dels vapors generats. La mostra es digerida fins que

la solució esdevé transparent, amb una certa tonalitat verd-blavosa. Finalment es treuen els tubs Kjeldhal del bloc del digestor i es deixen refredar. Per acabar afegim amb precaució 10mL d'aigua destil·lada a cada tub.

2. Destil·lació-fixació-valoració:

Es preparen una sèrie d'erlenmeyers (els mateixos que tubs Kjeldhal s'hagin utilitzat) per recollir el destil·lat amb 20mL de HCl (0,1M) i unes gotes de l'indicador roig de metil. Es col·loca l'erlenmeyer a la sortida per recollir el destil·lat i a continuació es posa el tub amb el digerit a l'altre extrem del destil·lador. Per iniciar el procés cal iniciar amb l'addició de 50mL de NaOH (40%), seguidament es comença a afegir vapor d'aigua i així s'inicia la destil·lació. Un cop acabada la destil·lació s'ha de valorar l'excés de HCl que no havia reaccionat amb l' NH_3 contingut al l'erlenmeyer. S'agafa l'erlenmeyer on hi ha el destil·lat i es valora amb NaOH (0,1M) amb factor conegut per tal de neutralitzar l'HCl que no ha reaccionat.

3. Estandardització de la solució de HCl (valoració del blanc):

Abans de realitzar la volumetria de neutralització cal fer una valoració prèvia (per a determinar la concentració exacta d'un dels reactius) que s'anomena blanc. Es pipetegen 20mL de HCl (0,1M) en un erlenmeyer i s'hi afegeixen unes gotes de roig de metil. S'omple la bureta amb NaOH (0,1M) amb factor conegut i es realitza la valoració. Aquest procés s'ha de fer 3 cops per tal d'obtenir un resultat fiable.

El volum consumit en la volumetria de neutralització del destil·lat es resta del volum de "blanc" per tal de poder arribar al contingut d'amoni que hi ha al tub Kjeldahl de les mostres.

4. Càlcul:

$$\%Norg\ sms = \frac{Volum\ (ml)valoració\ blanc - Volum\ (ml)valoració\ mostra}{Pes\ de\ la\ mostra\ digerida\ (g)} \cdot f\ (NaOH) \cdot 0,14$$

Per a expressar el percentatge de proteïna sobre la mostra seca cal multiplicar per 6,25 el contingut en percentatge del Nitrogen orgànic sobre mostra seca.

$$\%Proteïna = 6,25 \cdot \%Norg\ sms$$

2.3.6. Anàlisi mostra seca per a la determinació de fòsfor a l'alga:

Es fan dues repeticions per cada mostra a analitzar. Aquest anàlisi consta de quatre procediments completament diferenciats.

1. Determinació del contingut en matèria mineral:

S'obté a partir d'una gravimetria indirecta durant una calcinació. Aquesta consisteix en una combustió progressiva a l'aire de la matèria orgànica en un forn mufla a una temperatura de 550°C durant 14 hores. El residu restant després d'aquest procés se n'anomena matèria mineral o cendres.

Material.

- Balança analítica.
- Manta calefactora.
- Gresols.
- Forn mufla.
- Dessecador.

Procediment.

Primer de tot cal tarar els gresols prèviament pretractats a 550°C durant unes 2 hores i deixats refredar en un dessecador. A continuació s'introdueix 1,5 grams de mostra seca i triturada (per tal de que sigui homogènia). S'anota el pes amb 4 decimals de precisió.

Abans de posar el gresols a la mufla, cal precalcinar la mostra en una manta calefactora per tal d'evitar la inflamació de la mostra o bé la formació de carbó, en posar-la a la mufla, qual cosa podria alterar notablement els resultats. La precalcinació es dona per acabada quan la mostra deixa de treure fum.

S'introdueixen els gresols a la mufla i es deixen durant 14 hores a 550°C, aquest temps s'ha establert prèviament, determinant el temps d'exposició necessari per arribar a pes constant.

A continuació es mostra l'equació amb els càlculs necessaris per arribar al percentatge de matèria mineral (MM).

Càlcul i expressió de resultats:

$$\%MM_{sms} = \frac{Pes\ final\ (g) - Tara\ gresol\ (g)}{Pes\ mostra\ seca\ (g)} \cdot 100$$

2. Obtenció de la solució de cendres:

Un cop feta la calcinació, hem aconseguit eliminar la fracció orgànica de les mostres i ens queden els elements mineralitzats en forma de cendres. Aquestes al ser dissoltes en àcid i aplicant escalfor, es pot obtenir una solució que serveix per determinar molts elements minerals entre els quals ens interessa el fòsfor.

Material.

- Bany de sorra.
- Proveta de 15 mL.
- Matrassos aforats de 50 mL.
- Embuts.
- Paper de filtre.
- Tubs Falcon.

Reactius.

- Àcid nítric (HNO₃ 3M).
- Aigua destil·lada.

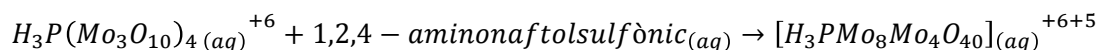
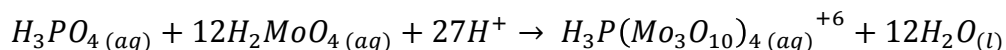
Procediment.

Es tracten les cendres amb 15 mL d'àcid nítric HNO_3 3M sobre un bany de sorra durant uns 20-30 minuts, aproximadament, fins a que el volum d'àcid s'hagi reduït a la meitat. Així doncs les cendres queden dissoltes en l'àcid, després de deixar refredar els gresols ja podem abocar el contingut dins el matràs de 50 mL amb l'ajut d'un embut i paper de filtre.

Es molt important no perdre cap gota de la solució de cendres així com esbandir bé tant el gresol com el paper de filtre amb aigua destil·lada uns 3 cops, per assegurar que tota la solució ha anat a parar al matràs. Seguidament cal enrasar el matràs, agitar-lo per tal d'homogeneïtzar la mostra i ja podem guardar el seu contingut (solució de cendres) en el tub Falcon a la nevera.

3. Quantificació del fòsfor, colorimetria de Bray-Kurtz:

La colorimetria ens permet quantificar una reacció de color. Els ions fosfat reaccionen en la solució àcida quan conte ions molibdat (*Reacció1.*), formant una molècula complexa: àcid molibdofosfòric ($\text{H}_3\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4(\text{aq})$) que amb l'addició d'un agent reductor (aminonaftolsulfònic_(aq)). Aquesta reacció produeix com a resultat el blau de molibdè, desenvolupant un color blau (*Reacció2.*), la intensitat del qual es proporciona a la concentració de ions fosfat i que presenta el seu màxim d'absorció a 660nm. S'ha de treballar en condicions molt controlades i llegir l'absorbància dins d'un període de temps molt curt.

**Material.**

- Matrassos aforats de 50,100 i 500 mL.
- Pipetes (2.5, 5, 10, 20 i 50 mL).
- Tubs d'assaig.
- Tubs Falcon.
- Agitador de tubs (Vòrtex).
- Espectrofotòmetre.

Reactius.

- Solució mare de fòsfor 100ppm (0.439 g KH_2PO_4 /1L).
- Solució de 20ppm de fòsfor (100ml de solució mare en 500ml).
- Solucions patró de fòsfor (1, 2, 4 i 10 mgP/L).
- Reactiu A (compost de Molibdè).
- Reactiu B (reductor).
- Aigua destil·lada.

Procediment.Preparació dels patrons:

A partir de la solució de 20 mg/L de fòsfor es preparen quatre solucions de diferent concentració (1, 2, 4 i 10 mgP/L), per a cobrir un rang lineal, establint una relació entre l'absorbància i la concentració de fòsfor.

Les solucions es preparen en matrassos aforats de 100 mL, agafant 5, 10, 20, 50 mL de la solució de 20 mg/L respectivament.

Dilució de la solució de cendres:

La solució de cendres, guardada anteriorment en els tubs Falcon, generalment té un contingut en fòsfor superior al del patró mes alt, per tant cal fer una dilució d'aquesta. Tenint en compte el contingut de fòsfor esperat i que els patrons oscil·len entre 1 i 10 mg/L, en el nostre cas, es realitza una dilució 1/20 de les solucions de cendres per a realitzar les lectures correctament.

S'agafen 2.5 mL de la solució de cendres amb una pipeta i s'enrasa amb aigua destil·lada en un matràs aforat de 50 mL. El contingut s'agita per tal d'homogeneïtzar la mostra i es guarda en uns altres tubs Falcon.

Reacció de color:

S'omplen els tubs d'assaig amb 10 mL de les dilucions de les solucions de cendres, un per cada mostra que es vol llegir, a més, s'omplen quatre tubs d'assaig amb les respectives solucions patró i un amb únicament aigua destil·lada que serà utilitzat de blanc.

A tots aquests tubs d'assaig, patrons blanc i mostres, s'afegeixen 10 gotes de reactiu A i 10 de reactiu B. Seguidament es remenen amb el vòrtex per tal d'homogeneïtzar la mostra i es deixa reposar 15 minuts per a que tingui lloc la reacció de color.

Lectura dels patrons i mostres:

Es llegeix l'absorbància a 660 nm. Primer de tot cal assignar el valor zero a l'aparell, això ho fem amb la lectura del blanc, seguidament ja es poden llegir els patrons i les mostres.

4. Càlcul del contingut de fòsfor:

Amb l'ajut d'un full de càlcul representem la recta de calibratge, coneixent l'equació d'aquesta podem trobar la concentració de fòsfor present a les dilucions i per tant a les solucions de cendres, ja que coneixem el factor de dilució. Tirant enrere en el procés podem arribar a conèixer la concentració de fòsfor a la mostra seca.

2.3.7. Determinació de la velocitat de rotació de l'alga.

Per determinar la velocitat de rotació de l'alga a l'últim experiment, es va dur a terme una aproximació. Aquesta consistia en recrear una alga amb un tros de plàstic. Això ens permet seguir la seva trajectòria en el tanc i cronometrar quant tarda en realitzar una volta. El quocient entre el temps determinat (en segons) i 60 segons, ens donarà les revolucions per minut.

2.3.8. Tractament estadístic dels resultats.

Per al càlcul de les diferències estadístiques s'ha fet servir l'anàlisi de variància ANOVA i la comparació múltiple amb el test Tukey d'un nivell de significació del 5% fent servir la plataforma InfoStat.

S'ha comparat la taxa de creixement específic (%SGR), el contingut de nitrogen (%N), de fòsfor (%P) i de clorofil·la a entre els dos tancs (N1 i N2), a cada un dels experiments per separat.

Com que ens interessava conèixer l'efecte de la disponibilitat de nutrients també s'han comparat les dades obtingudes del primer experiment envers les del segon.

2.3.9. Càlcul de la taxa d'eliminació.

Aquesta prové del producte entre la productivitat i el contingut de nitrogen o fòsfor, segons interressi, als teixits de l'alga.

3. Resultats i discussió

3.1. Comparació dels dos mètodes d'agitació en diferents situacions de disponibilitat de nutrients

3.1.1. Influència en el creixement

A la Figura 20 podem veure l'efecte de la disponibilitat de nutrients i el mètode d'agitació, en la taxa de creixement específic. Els resultats obtinguts mostren que el creixement no està influenciat pel mètode d'agitació, però sí que ho està per la disponibilitat de nutrients.

Amb excés de nutrients el %SGR es significativament superior que amb dèficit de nutrients, en ambdós mètodes d'agitació. No es compleix la hipòtesis de partida ja que esperàvem que amb dèficit de nutrients l'agitació amb aeració tingués avantatge respecte jets d'aigua.

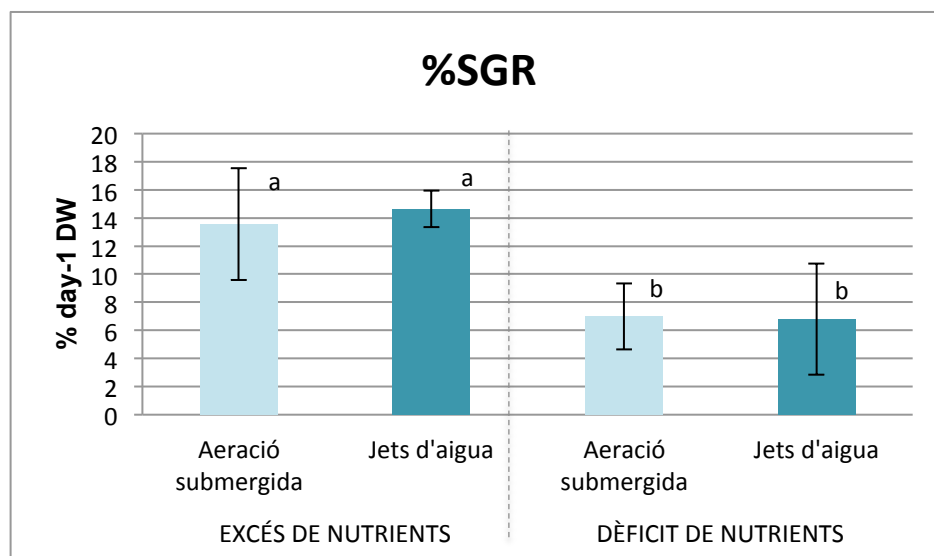


Figura 20. Taxa de creixement específic (%SGR), excés de nutrients en front de dèficit de nutrient, en ambdós mètodes d'agitació.

3.1.2. Influència en les concentracions de nitrogen i fòsfor als teixits

Les algues agitadaes pel sistema d'aeració inferior no mostren diferències en el contingut de nitrogen, independentment de la disponibilitat de nutrients. Però si s'observen diferències en el contingut de fòsfor; en excés de nutrients, el contingut de fòsfor es més elevat que en dèficit.

Les algues agitadaes per jets d'aigua presenten major contingut de nitrogen i fòsfor en excés de nutrients.

Observant les Figures 21 i 22, podem dir que en excés de nutrients el contingut de nitrogen i fòsfor, dels teixits de l'alga, no es veu influenciat pel mètode d'agitació utilitzat. En canvi en condicions de dèficit de nutrients, el contingut de nitrogen i fòsfor es major amb agitació per aeració inferior, reflectint-se això també en la taxa d'eliminació (Figures 23 i 24).

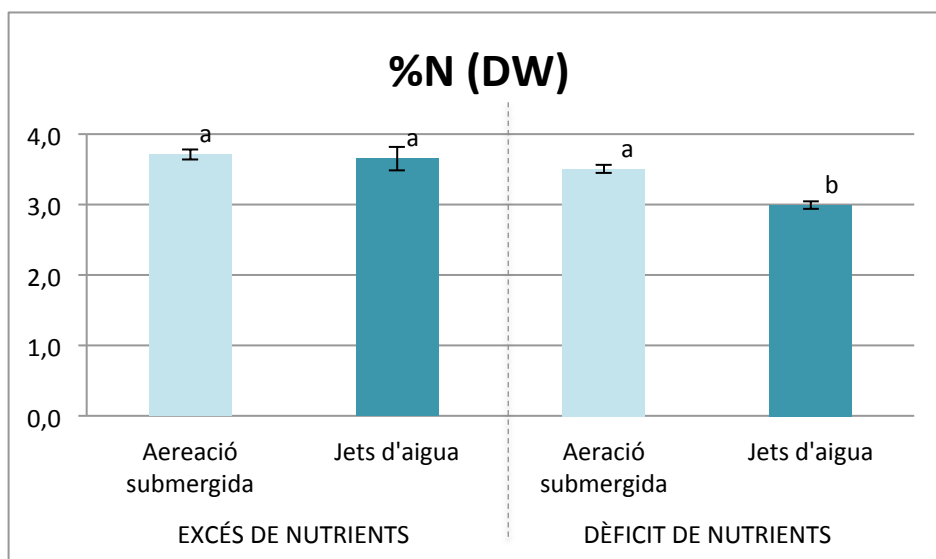


Figura 21. Contingut de nitrogen a l'alga, excés de nutrients en front de dèficit de nutrients, en ambdós mètodes d'agitació.

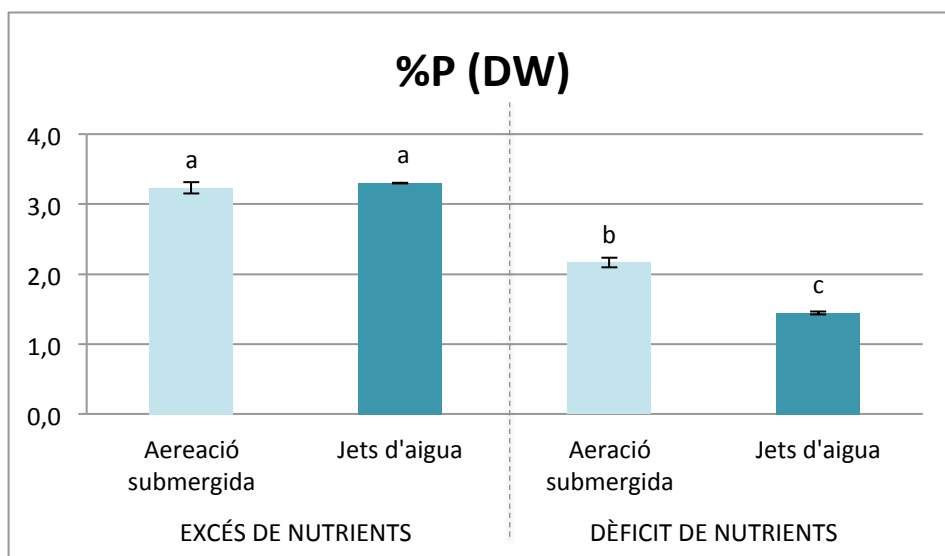


Figura 22. Contingut de fòsfor a l'alga, excés de nutrients en front de dèficit de nutrients, en ambdós mètodes d'agitació.

3.1.3. Influència en l'eliminació de nitrogen i fòsfor

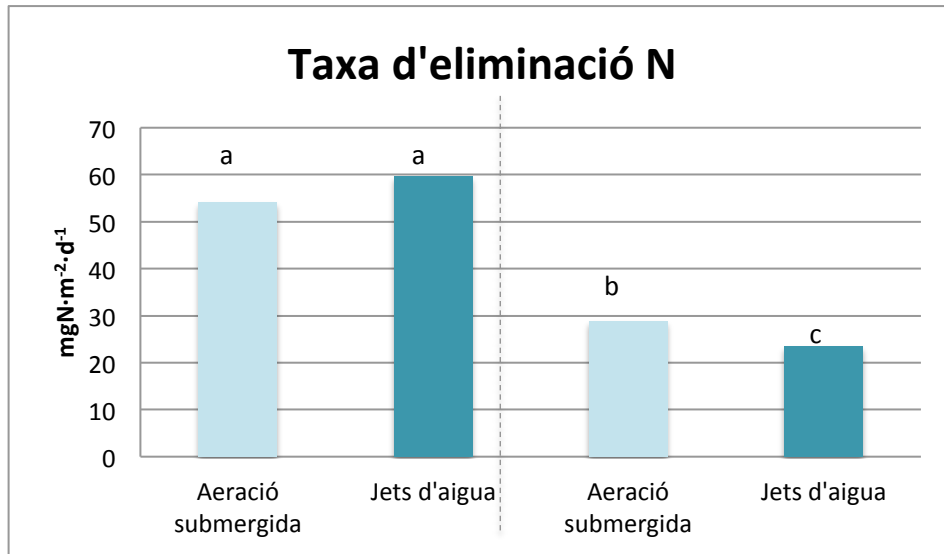


Figura 23. Taxa d'eliminació de nitrogen, excés de nutrients en front de dèficit de nutrients, en ambdós mètodes d'agitació.

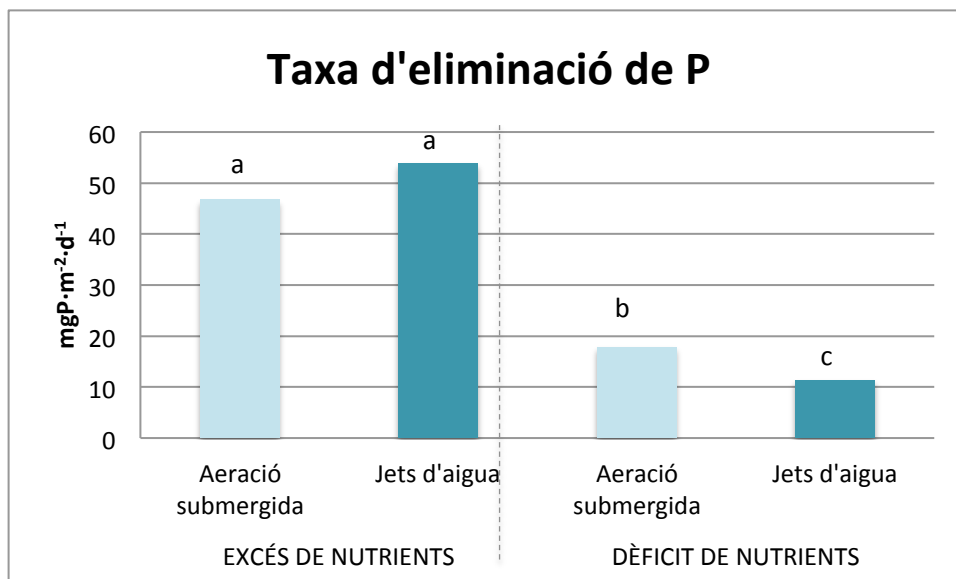


Figura 24. Taxa d'eliminació de fòsfor, excés de nutrients en front de dèficit de nutrients, en ambdós mètodes d'agitació.

A les figures 25 i 26 veiem l'evolució durant el segon experiment (dèficit de nutrients) del nitrogen i el fòsfor a l'aigua i a l'alga. En ambdós mètodes d'agitació, tot i la baixa concentració de nitrogen a l'aigua, aquest s'ha mantingut pràcticament constant en els teixits de l'alga. Això es degut a que el gènere *Ulva* es capaç d'emmagatzemar els excedents de nitrogen, així doncs el procés de creixement i la captació de nitrogen del medi són independents (Solidoro *et al.*, 1996). És per això que en el segon experiment no s'observen limitacions per nitrogen, per tant la disminució del creixement sembla haver estat provocada per la deficiència de fòsfor.

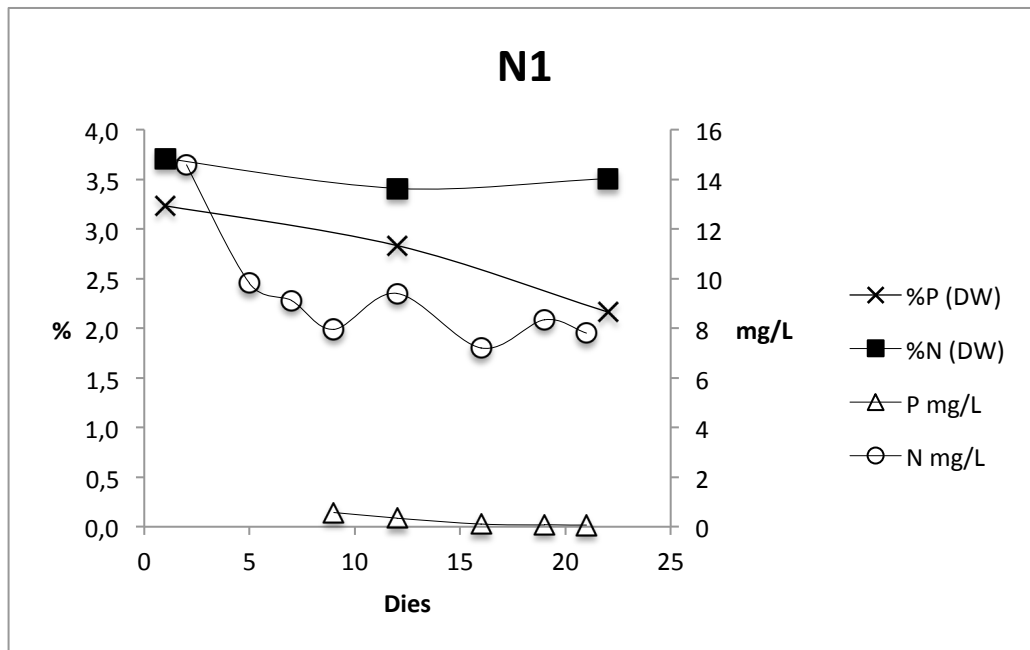


Figura 25. Evolució de la concentració de nitrogen i fòsfor tant a l'aigua com a l'alga durant el segon experiment (dèficit de nutrients). Tanc N1.

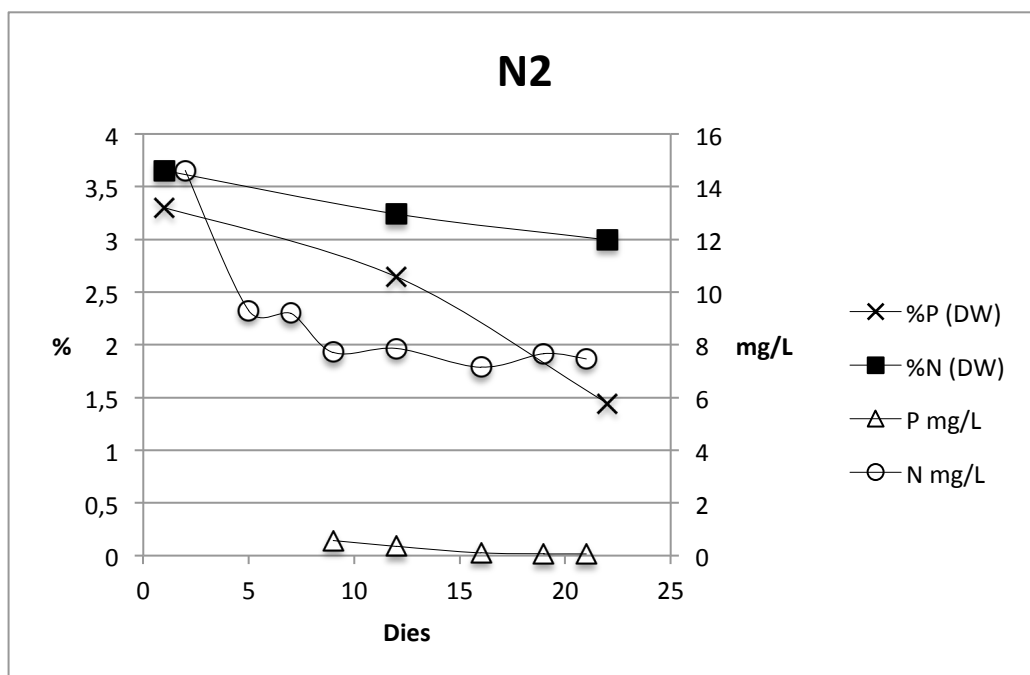


Figura 26. Evolució de la concentració de nitrogen i fòsfor tant a l'aigua com a l'alga durant el segon experiment (dèficit de nutrients). Tanc N2.

Un N:P ratio superior a 12-24 es indicatiu de limitació per fòsfor, en canvi un N:P ratio inferior a 8-16 és indicatiu de limitació per nitrogen (Buapet et al., 2008).

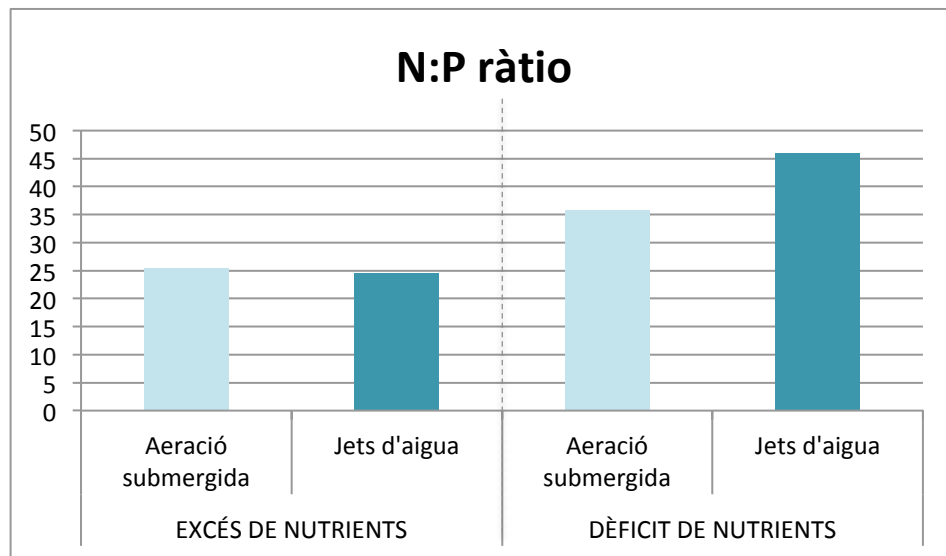


Figura 27. N:P ràtio en el teixit, excés de nutrients en front de dèficit de nutrients, en ambdós mètodes d'agitació.

El N:P ràtio (Figura 27) és 35,9 i 45,9 (Dèficit de nutrients: aeració submergida, jets d'aigua, respectivament) per tant podem afirmar que les limitacions en el creixement durant el segon experiment han sigut causades per la manca de fòsfor i no pel nitrogen.

3.1.4. Influència en la concentració de clorofil·la

Observant la Figura 28 s'observa que la clorofil·la segueix la mateixa tendència que el contingut en nitrogen en el teixit de l'alga. Aquesta no es veu influenciada pel mètode d'agitació quan es troba en excés de nutrient, però, quan aquests són limitants l'agitació amb jets d'aigua presenta un contingut en clorofil·la inferior.

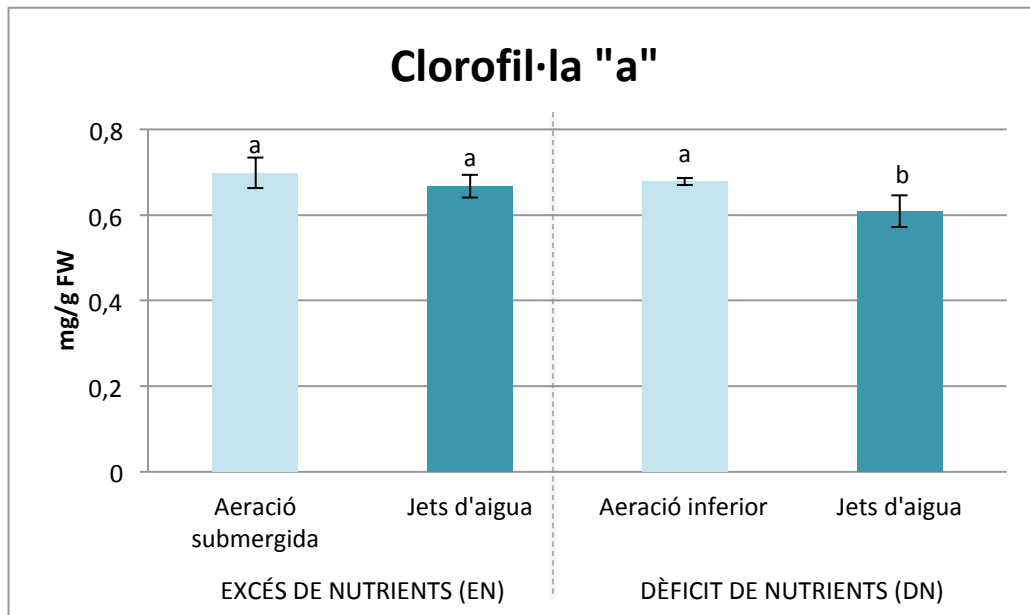


Figura 28. Contingut de clorofil·la a l'alga, excés de nutrients en front de dèficit de nutrients, en ambdós mètodes d'agitació.

En el primer experiment s'ha vist que amb excés de nutrients, el creixement (%SGR), el nitrogen (%N), el fòsfor (%P) i el contingut en clorofil·la no han presentat diferència entre ambdós sistemes d'agitació. S'ha vist que en *Ulva reticulata*, una elevada concentració de nitrogen en el medi, repercuteix en un augment en la concentració de clorofil·la als teixits, en els nutrients presents als teixits i en el creixement (Buapet et al., 2008).

En canvi en el segon experiment (dèficit de nutrients), el contingut en clorofil·la a, nitrogen (%N), fòsfor (%P), s'han mostrat superior amb l'agitació per aeració submergida. Podent-se corroborar amb resultats d'altres autors com Msuya i Neori (2008).

L'aeració genera una turbulència major que l'agitació mitjançant jets d'aigua, qual cosa fa disminuir la capa límit, incrementant la exposició a la llum i la difusió dels nutrients des de l'aigua cap a l'alga. Aquesta major difusió només té efecte en la captació de nitrogen i fòsfor quan els nutrients en són limitants (Buapet et al., 2008).

3.2. Influència del cabal d'aeració en el creixement, en la concentració de Clorofil·la i fòsfor als teixits.

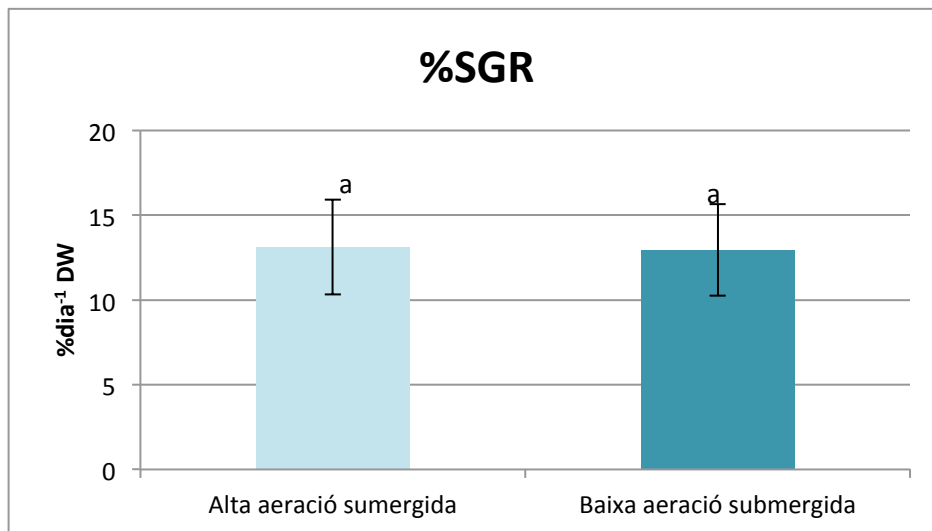


Figura 29. Taxa de creixement específic (%SGR), alta aeració submergida en front de baixa aeració submergida.

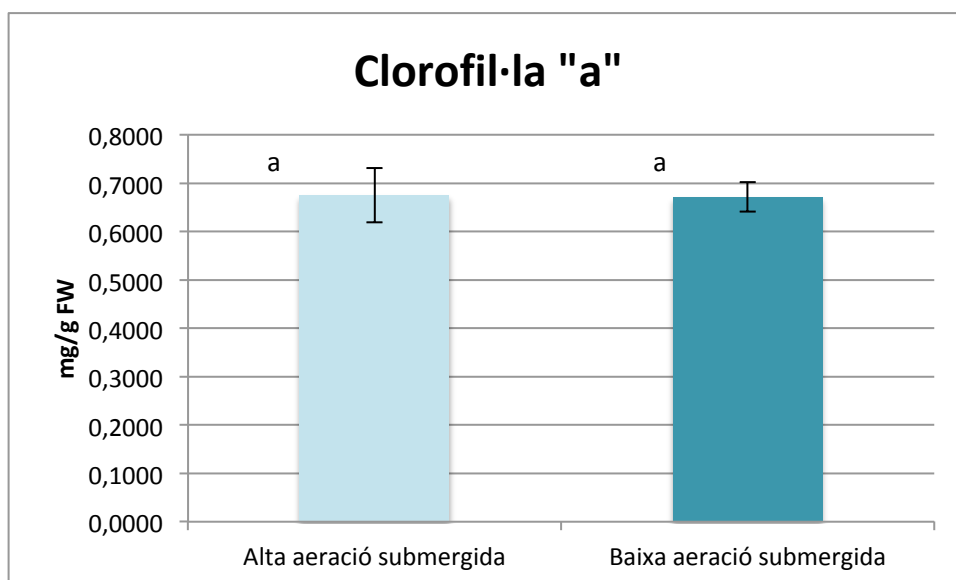


Figura 30. Contingut de clorofil·la a l'alga, alta aeració submergida en front de baixa aeració submergida.

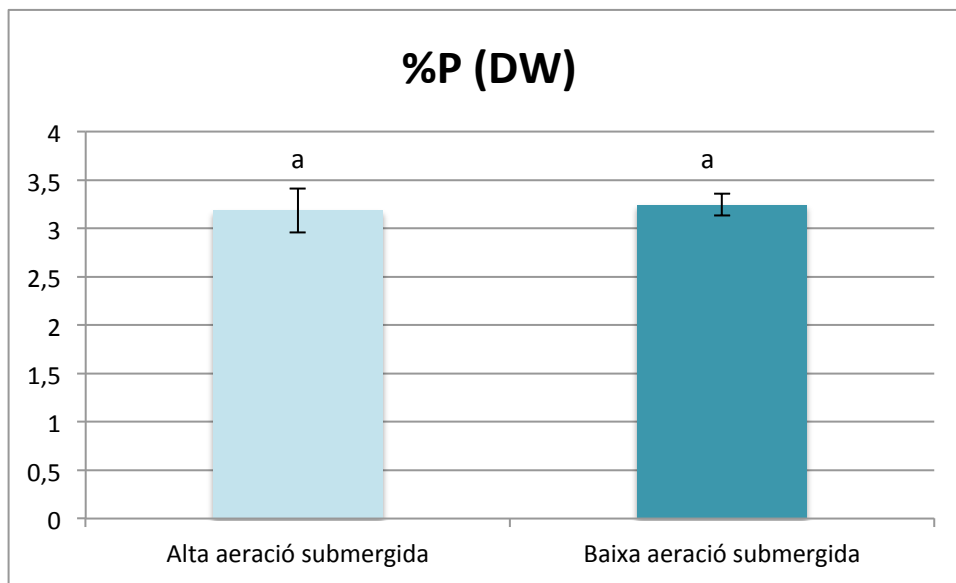


Figura 31. Contingut de fòsfor a l'alga, alta aeració submergida en front de baixa aeració submergida.

En aquest últim experiment, les algues es trobaven en condicions favorables en termes de disponibilitat de nutrients i com es pot veure a les Figures 29, 30 i 31, no s'observen diferències entre les dues agitacions. Tot i haver reduït el cabal d'agitació d'un dels tancs a la meitat, les revolucions per minut de les algues es veuen lleument afectades (3,87 i 3,03 respectivament). Aquest fet ens permet reduir els cabals d'aire que generen l'agitació, aconseguint, a nivell industrial, un estalvi energètic i alhora econòmic, sense patir diferències en el creixement.

4. Conclusions

En aquest treball s'ha analitzat l'efecte del mètode d'agitació i la disponibilitat de nutrients, en un cultiu d'*Ulva ohnoi*. Primer comparant si hi han diferències entre l'agitació per aeració submergida i jets d'aigua, en condicions d'excés i dèficit de nutrients. També s'ha comparat si amb aeració submergida hi han diferències entre diferents velocitats de rotació.

Gràcies a les dades obtingudes a través dels diversos anàlisis, hem pogut arribar a les següents conclusions:

El mètode d'agitació no repercuteix de cap manera quan ens trobem en condicions d'excés de nutrients.

Si els nutrients són limitants, la reducció del gruix de la capa límit juga un paper molt important en la captació d'aquests. Per tant el mètode d'agitació que proporcioni més turbulència en facilitarà l'accés. És per això que s'han observat diferències en el contingut de nitrogen, fòsfor i clorofil·la entre els dos mètodes d'agitació, obtenint un cert avantatge l'agitació per aeració submergida.

S'ha pogut comprovar que *Ulva ohnoi* es capaç d'emmagatzemar els excedents de nitrogen, així doncs quan les concentracions de nitrogen en els teixits són altes, el creixement de l'alga i la concentració de nitrogen a l'aigua són independents. En canvi, al observar que al disminuir el fòsfor a l'aigua també disminueix el seu contingut de manera dràstica a l'alga, hem pogut concloure que la disponibilitat de fòsfor sí pot haver condicionat la taxa de creixement.

No s'observen diferències entre el cabal d'agitació submergida de 8 i 4 L·min⁻¹. Aquest fet ens indica que es poden reduir els caudals d'aire que generen l'agitació, aconseguint, a nivell industrial, un estalvi energètic i alhora econòmic.

5. Bibliografia

- Abreu, M., R. Pereira, Ch. Yarish, A.H. Buschmann & I. Sousa-Pinto. (2011). IMTA with *Gracilaria vermiculophylla*: productivity and nutrient removal performance of the seaweed in a land-based pilot scale system. *Aquaculture*, 312: 77-87 pp.
- Alabi, A., Chiesa, M., Garlisi, C., Palmisano, G. (2015). Advances in anti-scale magnetic water treatment. *Environmental Science: Water Research & Technology*, 1: 408-425 pp.
- Angell, A., Mata, L., de Nys, R., Paul, N. (2015). Indirect and direct effects of salinity on the quantity and quality of total amino acids in *Ulva ohnoi* (Chlorophyta). *Journal Of Phycology*, 51: 536-545 pp.
- APHA. (1992). APHA Method 4500-NO₃: Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 552 pp.
- APROMAR,. (2014). Estudio general: Una primera aproximación al sector de las macroalga. 4-17 pp. Cádiz: APROMAR.
- Azterkosta Monográficos. (2008). Itsasoko algak eta beraien erabilerak las algas marinas y sus usos. Retrieved from http://www.ingurumena.ejgv.euskadi.eus/contenidos/documentacion/monograficos_azterkosta/es_def/adjuntos/Azterkosta01.pdf
- Beer S (1994) Mechanisms of inorganic carbon acquisition in marine macroalgae (with special reference to the Chlorophyta). *Prog Phycol Res* 10: 179–207 pp.
- Bird, M., Wurster, C., de Paula Silva, P., Bass, A., de Nys, R. (2011). Algal biochar – production and properties. *Bioresource Technology*, 102: 1886-1891 pp.
- Björk M, Haglund K, Ramazanov Z, Pedersen M (1993) Inducible mechanism for HCO₃– utilization and repression of photorespiration in protoplasts and thallus of three species of *Ulva* (Chlorophyta). *J Phycol* 29: 166–173 pp.
- Bolton JJ, Robertson-Andersson DV, Shuuluka D, Kandjengo L (2009) Growing *Ulva* (Chlorophyta) in integrated systems as a commercial crop for abalone feed in South Africa: a SWOT analysis. *Journal of Applied Phycology*, 21, 575–583 pp.
- Bracken, M. E. S., and J. J. Stachowicz. (2006). Seaweed diversity enhances nitrogen uptake via complementary use of nitrate and ammonium. *Ecology* 87: 2397-2403 pp.

- Buapet, P., Hiranpan, R., J. Ritchie, R., & Pratthep, A. (2008). Effect of nutrient inputs on growth, chlorophyll, and tissue nutrient concentration of *Ulva reticulata* from a tropical habitat. *ScienceAsia*, 34(2), 245 pp.
- Casais Caamaño, E. (2016). Desarrollo de cultivos de "Ulva" (Ulvales, Chlorophyta) como biofiltro en sistemas de AMTI.
- Coutinho, R., & Zingmark, R. (1993). Interactions of light and nitrogen on photosynthesis and growth of the marine macroalga *Ulva curvata* (Kützinger) De Toni. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 167(1), 11–19 pp.
- Chopin, T. (2013). Aquaculture Aquaculture, Integrated Multi-trophic (IMTA) aquaculture integrated multi-trophic (IMTA). In *Sustainable Food Production*. 184–205) pp.
- Cole, A., de Nys, R., Paul, N. (2014). Removing Constraints on the Biomass Production of Freshwater Macroalgae by Manipulating Water Exchange to Manage Nutrient Flux. *Plos ONE*, 9: 128-135 pp.
- Copertino, M., Tormena, T., Seeliger, U. (2008). Biofiltering efficiency, uptake and assimilation rates of *Ulva clathrata* (Roth) J. Agardh (Chlorophyceae) cultivated in shrimp aquaculture waste water. *J Appl Phycol*, 21: 31-45 pp.
- Crépineau, F., Roscoe, T., Kaas, R., Kloareg, B., & Boyen, C. (2000). Characterisation of complementary DNAs from the expressed sequence tag analysis of life cycle stages of *Laminaria digitata* (Phaeophyceae). *Plant Molecular Biology*, 43(4), 503–513 pp.
- Christie, H., Norderhaug, K., & Fredriksen, S. (2009). Macrophytes as habitat for fauna. *Marine Ecology Progress Series*, 396, 221–233.
- Diplohaplontic Life cycle in Algae | Plant Science 4 U. (n.d.). Retrieved January 30, 2018, from <http://www.plantscience4u.com/2014/05/diplohaplontic-life-cycle-in-algae.html#.Wm-9hpOdVE4>
- Duke, Cl. S., Lapointe, B. E., & Ramus, J. (1986). EFFECTS OF LIGHT ON GROWTH, RuBPCase ACTIVITY AND CHEMICAL COMPOSITION OF ULVA SPECIES (CHLOROPHYTA). *Journal of Phycology*, 22(3), 362–370 pp.
- FAO. (1990). Training Manual on Gracilaria Culture and Seaweed Processing in China. (n.d.). Retrieved January 18, 2018.
- FAO. (2006). Fisheries Department. State of world aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper. No. 500. Rome, FAO. 2006. 134 pp.
- FAO. (2014). El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2014. Roma. 253 pp.

- Friedlander, M. i Levy, I. (1995) Cultivation of *Gracilaria* in outdoor tanks and ponds. *Journal of Applied Phycology*, 7: 315-324 pp.
- Gao, G. (2016). Developing systems for the commercial culture of *Ulva* species in the UK. Ph.D. Thesis, Newcastle University, UK.
- GISD. (n.d.). Retrieved January 25, 2018, from <http://www.iucngisd.org/gisd/speciesname/Undaria+pinnatifida>
- Grasshoff, K., Ehrhardt, M., Kremling, K., Anderson, L. (1999). Methods of seawater analysis. Weinheim: Wiley-VCH. 4-88 pp.
- Hargrave B.T. (2005) Environmental Effects of Marine Finfish Aquaculture, Handbook of Environmental Chemistry, Springer, Berlin Heidelberg New York.
- Henriques, Marta & Silva, A & Rocha, J.M.s. (2007). Extraction and quantification of pigments from a marine microalga: A simple and reproducible method. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*.
- Hernández, I., Fernández-Engo, M. A., Pérez-Lloréns, J. L., & Vergara, J. J. (2005). Integrated outdoor culture of two estuarine macroalgae as biofilters for dissolved nutrients from *Sparus auratus* waste waters. *Journal of Applied Phycology*, 17(6), 557–567 pp.
- Huang, Y., & Rorrer, G. L. (2002). Optimal temperature and photoperiod for the cultivation of *Agardhiella subulata* microplantlets in a bubble-column photobioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 79(2), 135–144 pp.
- Kirby, A. (2001). Monterey Bay Aquarium Research Institute.
- Lawton RJ, Mata L, de Nys R, Paul NA (2013) Algal Bioremediation of Waste Waters from Land-Based Aquaculture Using *Ulva*: Selecting Target Species and Strains.
- Lee, J., Cho, C. H., Park, S. I., Choi, J. W., Song, H. S., West, J. A., ... Yoon, H. S. (2016). Parallel evolution of highly conserved plastid genome architecture in red seaweeds and seed plants. *BMC Biology*, 14(1), 75 pp.
- Lobban, C. S. and Harrison, P. J. (1994). Seaweed ecology and physiology. Cambridge University Press. Cambridge. 366 pp.
- Longstaff, B., Kildea, T., Runcie, JW., Cheshire, A., Dennison, WC., Hurd, C, Kana T., Raven, JA. (2002). An in situ study of photosynthetic oxygen exchange and electron transport rate in the marine macroalga *Ulva lactuca* (Chlorophyta). *Photosynthesis Research*, 74: 281-293 pp.
- Lüning, K. (1990) Seaweeds: Their environment, biogeography and ecophysiology. John Wiley and sons. Inc. Interscience. 527 pp.

- Lupatsch I. y Kissil G.W. (1998) Predicting aquaculture waste from gilthead seabream (*Sparus aurata*) culture using a nutritional approach. *Aquatic Living Resources*, 11(4): 265– 268 pp.
- MACROCYSTIS PYRIFERA, GIANT BLADDER KELP. (n.d.). Retrieved January 23, 2018, from http://www.starthrower.org/research/kelpmisc/kelp_mp.htm
- Magnoni, L. J., Martos-Sitcha, J. A., Queiroz, A., Calduch-Giner, J. A., Gonçalves, J. F. M., Rocha, C. M. R., Pérez-Sánchez, J. (2017). Dietary supplementation of heat-treated *Gracilaria* and *Ulva* seaweeds enhanced acute hypoxia tolerance in gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Biology Open*, 6(6), 897–908 pp.
- Menéndez, M., Martínez, M., & Comín, F. A. (2001). A comparative study of the effect of pH and inorganic carbon resources on the photosynthesis of three floating macroalgae species of a Mediterranean coastal lagoon. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 256(1), 123–136 pp.
- Mata, L., Magnusson, M., Paul, N., de Nys, R. (2015). The intensive land-based production of the green seaweeds *Derbesia tenuissima* and *Ulva ohnoi*: biomass and bioproducts. *J Appl Phycol*, 28: 365- 375 pp.
- Milledge, J., Smith, B., Dyer, P., & Harvey, P. (2014). Macroalgae-Derived Biofuel: A Review of Methods of Energy Extraction from Seaweed Biomass. *Energies*, 7(12), 7194–7222 pp.
- Msuya, F. and Neori, A. (2008) Effect of Water Aeration and Nutrient Load Level on Biomass Yield, N Uptake and Protein Content of the Seaweed *Ulva lactuca* Cultured in Seawater Tanks. *Journal of Applied Phycology*, 20, 1021-1031 pp.
- Neori, A., M. Shpigel, and D. Ben-Ezra. (2000). A sustainable integrated system for culture of fish, seaweed and abalone. *Aquaculture* 186: 279-291 pp.
- Neori, A., Chopin, T., Troell, M., Buschmann, A. H., Kraemer, G. P., Halling, C., Yarish, C. (2004). Integrated aquaculture: rationale, evolution and state of the art emphasizing seaweed biofiltration in modern mariculture. *Aquaculture*, 231: 361-391 pp.
- Neveux, N., Yuen, A., Jazrawi, C., Magnusson, M., Haynes, B., Masters, A. (2014). Biocrude yield and productivity from the hydrothermal liquefaction of marine and freshwater green macroalgae. *Bioresource Technology*, 155: 334-341 pp.
- Papageorgiou, S. K., Katsaros, F. K., Kouvelos, E. P., Nolan, J. W., Le Deit, H., & Kanellopoulos, N. K. (2006). Heavy metal sorption by calcium alginate beads from *Laminaria digitata*. *Journal of Hazardous Materials*, 137(3), 1765–1772 pp.
- Pedersen, A., Kraemer, G., Yarish, C. (2004) The effects of temperature and nutrient concentrations on nitrate and phosphate uptake in different species of *Porphyra*

- from Long Island Sound (USA). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 312: 235-252 pp.
- Ren, J. S., Barr, N. G., Scheuer, K., Schiel, D. R., & Zeldis, J. (2014). A dynamic growth model of macroalgae: Application in an estuary recovering from treated wastewater and earthquake-driven eutrophication. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 148, 59–69 pp.
- Ridler, N., Wowchuk, M., Robinson, B., Barrington, K., Chopin, T., Robinson, S., ... Boyne-Travis, S. (2007). Integrated multi – trophic aquaculture (imta): a potential strategic choice for farmers. *Aquaculture Economics & Management*, 11(1), 99–110 pp.
- RIRDC Publication No. 09/005. Innovation for rural Australia Seaweed Culture in Integrated Multi-Trophic Aquaculture —Nutritional Benefits and Systems for Australia— NEW PLANT PRODUCTS. (n.d.).
- Silberfeld, T., Rousseau, F., & Reviers, B. de. (2014). An Updated Classification of Brown Algae (Ochrophyta, Phaeophyceae). *Cryptogamie, Algologie*, 35(2), 117–156 pp.
- Smit AJ. (2004). Medicinal and pharmaceutical uses of seaweed natural products: A review. *J. Appl. Phycol.* 16: 245–262 pp.
- Solidoro, C., Pecenik, G., Pastres, R., Franco, D., Dejak, C. (1996). Modelling macroalgae (*Ulva rigida*) in the Venice lagoon: model structure identification and first parameters estimation. *Ecol. Model.* 94, 191–206 pp.
- Soto, D., & Norambuena, F. (2004). Evaluation of salmon farming effects on marine systems in the inner seas of southern Chile: a large-scale mensurative experiment. *Journal of Applied Ichthyology*, 20(6), 493–501 pp.
- Soto, D. (2009). Integrated mariculture: a global review (No. 529). Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 183 pp.
- Timmons, M. & Ebeling, J. (2002). Recirculating aquaculture systems. Ithaca, NY: Cayuga Aqua Ventures.
- Wang, Q., Dong, S., Tian, X., & Wang, F. (2007). Effects of circadian rhythms of fluctuating temperature on growth and biochemical composition of *Ulva pertusa*. *Hydrobiologia*, 586(1), 313–319 pp.
- Wichard, T. (2015). Exploring bacteria-induced growth and morphogenesis in the green macroalga order Ulvales (Chlorophyta). *Frontiers in Plant Science*, 6 pp.
- Yokoyama, H., Ishihi, Y., Abo, K., & Takashi, T. (2010). Quantification of waste feed and fish feces using stable carbon and nitrogen isotopes. Quantification of Waste Feed and Fish Feces Using Stable Carbon and Nitrogen Isotopes., (No.31), 71–76 pp.

- Yoon, H. S., Muller, K. M., Sheath, R. G., Ott, F. D., & Bhattacharya, D. (2006). Defining the major lineages of red algae (rhodophyta). *Journal of Phycology*, 42(2), 482–492 pp.
- Zou, D. (2014). The effects of severe carbon limitation on the green seaweed, *Ulva conglobata* (Chlorophyta). *Journal of Applied Phycology*, 26(6), 2417–2424 pp.